

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-510334
(P2003-510334A)

(43)公表日 平成15年3月18日 (2003.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マート [*] (参考)
A 6 1 K 38/00	Z NA	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 2 4
39/00		39/04	4 B 0 6 5
39/04		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 31/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/06		35/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 125 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-526571(P2001-526571)
(86) (22)出願日	平成12年9月29日 (2000.9.29)
(85)翻訳文提出日	平成14年4月1日 (2002.4.1)
(86)国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 2 7 0 2 3
(87)国際公開番号	W O 0 1 / 0 2 3 4 2 1
(87)国際公開日	平成13年4月5日 (2001.4.5)
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 5 6, 8 2 1
(32)優先日	平成11年9月30日 (1999.9.30)
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 6 3, 1 3 8
(32)優先日	平成11年11月2日 (1999.11.2)
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)

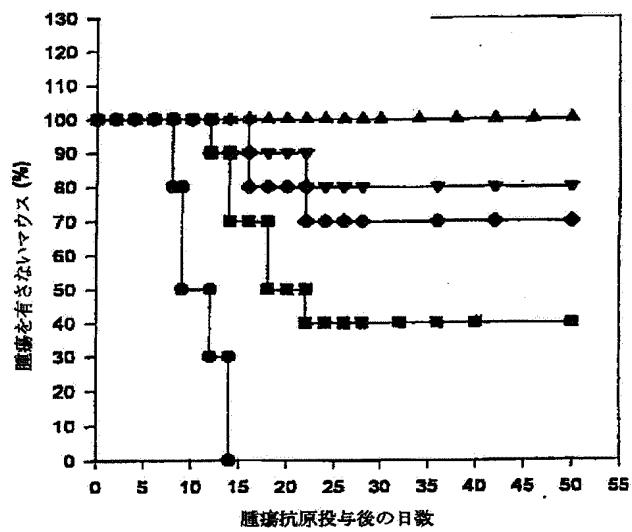
(71)出願人	コリクサ コーポレイション アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シアトル、コロンビア ストリート 1124, スイート 200
(71)出願人	ヘルス リサーチ インコーポレイテッド Health Research, Inc.
	アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14263、 バッファロー、エルム アンド カールトン ストリーツ (番地なし)、ロズウェル パーク キャンサー インスティテュ ト ディヴィジョン内

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌及び感染症の予防及び治療のためのストレスタンパク質組成物及び方法

(57)【要約】

ストレスタンパク質複合体およびこのような複合体をコードする関連分子またはこのような分子を提示する細胞を含む薬学的組成物が提供される。ストレスタンパク質複合体は、免疫原性ポリペプチドと複合体化されたhsp10またはgrp170ポリペプチドを含む。ストレスタンパク質複合体の免疫原性ポリペプチドは癌または感染症に関連し得る。本発明の薬学的組成物は被検体に投与することができ、それにより、ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*) 感染を阻害する方法、腫瘍増殖を阻害する方法、癌の発生を阻害する方法、および感染症を治療または予防する方法が提供される。本発明は、T細胞を、hsp110またはgrp170ポリペプチドおよび腫瘍またはヒト型結核菌感染細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するように改変されたAPCと接触させる、腫瘍細胞またはヒト型結核菌感染細胞に向かうT細胞を産生する方法をさらに提供する。この方法により產生されるT細胞およびこのようなT細胞を含む薬学的組成物が本発明に含まれる。ヒト型結核菌感染細胞を殺傷する方法において、前記のT細胞とヒト型結核菌感染細胞を接触させることができ、



【特許請求の範囲】

【請求項1】ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物であつて、該複合体がhsp110又はgrp170ボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを含み、該免疫原性ボリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。

【請求項2】免疫原性ボリペプチドがher-2/neuペプチドを含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】her-2/neuペプチドが、her-2/neuの細胞内ドメインに由来する、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項4】ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物であつて、該複合体がhsp110又はgrp170ボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを含み、該免疫原性ボリペプチドがヒト型結核菌(*M. tuberculosis*)抗原を含んでいる、薬学的組成物。

【請求項5】ヒト型結核菌抗原がMt b8.4又はMt b39である、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項6】hsp110又はgrp170ボリペプチドが免疫原性ボリペプチドに複合されている、請求項1～5のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項7】hsp110又はgrp170ボリペプチドが、非共有結合型相互作用により免疫原性ボリペプチドに複合されている、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項8】複合体が融合タンパク質を含む、請求項1～5のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項9】複合体が腫瘍に由来している、請求項1、2又は3記載の薬学的組成物。

【請求項10】複合体がヒト型結核菌感染細胞に由来している、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項11】ストレスタンパク質複合体が、hsp70、grp90、grp78、及びgrp94ストレスタンパク質ファミリーの構成要素からなる群より選択されるボリペプチドをさらに含む、請求項1～10のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項12】ストレスタンパク質複合体が、hsp70及びhsp25に複合されたhsp110を含む、請求項1～11のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3】 hsp110 又は grp170 ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチドを含み、該免疫原性ポリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。

【請求項 1 4】 hsp110 又は grp170 ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチドを含み、該免疫原性ポリペプチドがヒト型結核菌抗原を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 5】 第1のポリヌクレオチドが第2のポリヌクレオチドに連結されている、請求項13又は14記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】 hsp110 又は grp170 ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを提示するように修飾された抗原提示細胞(APC)を含み、該免疫原性ポリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。

【請求項 1 7】 hsp110 又は grp170 ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを提示するように修飾された抗原提示細胞(APC)を含み、該免疫原性ポリペプチドがヒト型結核菌抗原を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 8】 APCが樹状細胞又はマクロファージである、請求項16又は17記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】 APCがペプチド負荷により修飾されている、請求項16、17又は18記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】 APCが、hsp110 又は grp170 ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチド及び免疫原性ポリペプチドをコードしている第2のポリヌクレオチドによるトランスクエクションにより修飾されている、請求項16、17又は18記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1】 第1のポリヌクレオチドが第2のポリヌクレオチドに連結されている、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】 様合体が、hsp110 又は grp170 ポリペプチドと免疫原性ポリペプチドとの結合を増強するよう加熱されている、請求項 1 ~21 のいずれか 1 項記載の薬学的組成物。

【請求項 2 3】 生理的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 ~22 のい

ずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項24】 アジュバントをさらに入れる、請求項1～23のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項25】 T細胞を抗原提示細胞(APC)と接触させる段階を含み、該APCが grp170又はgrp110性の接觸により修飾されている、腫瘍細胞に対する免疫原性により修飾されたT細胞を作製する方法。

【請求項26】 T細胞がCD4+又はCD8+T細胞である、請求項25記載の方
法。

【請求項27】 請求項24又は25記載の方法により作製されたT細胞。

【請求項28】 腫瘍細胞を殺傷するための組成物の調製のための、請求項27記載のT細胞の使用。

【請求項29】 T細胞を抗原提示細胞(APC)と接触させた段階を含み、該APCが grp170又はgrp110性の接觸により修飾されたT型結核菌感染細胞に関連する免疫原性により修飾されている、ヒト型結核菌感染細胞に対するT細胞を作製する方法。

【請求項30】 T細胞がCD4+又はCD8+T細胞である、請求項29記載の方
法。

【請求項31】 請求項29又は30記載の方法により作製されたT細胞。

【請求項32】 ヒト型結核菌感染細胞を殺傷するための組成物の調製のための、請求項31記載のT細胞の使用。

【請求項33】 被験者においてヒト型結核菌感染を阻害するための組成物の調製のための、請求項4～8、10～12、15又は17～24のいずれか1項記載の薬学的組成物の使用。

【請求項34】 被験者において腫瘍増殖を阻害するための組成物、被験者において癌の発症を阻害するための組成物、もしくは被験者において癌抗原に対する免疫応答を増強するための組成物の調製のための、請求項1～3、6～9、11～13、15～16又は18～24のいずれか1項記載の薬学的組成物の使用。

【請求項35】 請求項27記載のT細胞と生体試料を接触させる段階を含む、生体試料から腫瘍細胞を除去する方法。

【請求項36】生体試料が血液又はその画分である、請求項35記載の方法

【請求項37】ストレスタンパク質複合体を加熱する段階を含み、該ストレスタンパク質複合体が熱誘導性ストレスボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを含んでいる、ストレスタンパク質複合体の免疫原性を増強する方法。

【請求項38】加熱段階がストレスタンパク質複合体を約39～40℃の温度に加熱する段階を含む、請求項37記載の方法。

【請求項39】ストレスボリペプチドがhspl10又はhspl70を含む、請求項37又は38記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本明細書は、米国仮出願である1999年9月30日に出願された第60/156,821号、1999年11月2日に出願された第60/163,168号、及び2000年6月30日に出願された第60/215,497号の恩典を請求するものであり、それら各自の内容全體が本明細書に参照として組入れられている。本明細書を通じて、様々な文献が参照される。これららの文献の内容は、本発明が属する技術分野の状況をより十分に説明するため、その全體が本明細書に参照として組入れられている。

【0002】

本明細書に開示された発明は、米国の国立衛生研究所(NIH)の基金第GM 45994号の支援の下で行われた研究の一環である。米政府は、本発明に対し一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は概して、癌及び感染症の予防及び治療に関する。本発明はより詳細に述べると、免疫原性ポリペプチドに複合された、熱ショックタンパク質110(hsp110)又はグルコース調節タンパク質170(grp170)のようなストレスタンパク質の少なくとも一部を含むポリペプチド、並びにこのようなストレスタンパク質及び免疫原性ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに加え、ストレスタンパク質及び免疫原性ポリペプチドを提示する抗原提示細胞に関する。このようなポリペプチド、ポリヌクレオチド及び抗原提示細胞は、癌及び感染症の予防及び治療のためのワクチン及び薬学的組成物において使用することができる。本発明は更に、加熱などによるストレスタンパク質複合体の効力の増強に關する。

【0004】

発明の背景

癌及び感染症は、世界中で重大な健康上の問題である。これらの疾患の検出及び治療において進展が見られるが、予防又は治療のためのワクチンもしくは他の万能の方法は現時点で利用することができない。一般に化学療法又は手術及び放射線療法の組合せを基にした現在の療法は、多くの患者において不適切であるこ

とが証明され続けている。

【0005】

例えば、原発性乳癌は、外科的切除により効率良く治療されることが多い。しかし更に疾患が再発した場合、追加療法の選択肢には制限があり、かつ全身疾患の治療の効果的手段はない。自家腫瘍に対する免疫応答が認められるものの、これらは疾患の管理には効力がない。更なる抗腫瘍反応を刺激するための努力が、ワクチンに有用な腫瘍抗原の同定に向けられている。これに関連する方法は、熱ショックタンパク質、例えばhsp70の雑多なペプチド結合特性を利用している。これらの分子シヤベロンは、ペプチドに結合し、かつ多くのタンパク質フォールディング、輸送及び集成功能に関連し、かつMHC複合体の抗原提示経路に関連している可能性がある。

【0006】

哺乳類細胞の熱ショックタンパク質は、関連するタンパク質の配列のいくつかのファミリーに分類することができる。タンパク質発現レベルを基にした主な哺乳類hspは、質量(およそ)25kDa(hsp25)、70kDa(hsp70)、90kDa(hsp90)及び110kDa(hsp110)である細胞質／核タンパク質である。しかしひspに加え、ストレスタンパク質の第2のセットは、小胞体(ER)に局在している。これらストレスタンパク質の誘導は、hspのように高温ストレスに容易に反応しないが、ERの機能を妨害するようなストレス(例えば、グルコース飢餓及びコシル化の阻害、無酸素状態、及び還元状態、又はカルシウムホメオスタシスを妨害する特定の物質)により調節される。これらストレスタンパク質は、グルコース調節タンパク質(grps)と称される。主なgrpsは、発現を基に、近似サイズ78kDa(grp78)、94kDa(grp94)、及び170kDa(grp170)を有する。grp78は、細胞質hsp70と相同性を有し、一方grp94はhsp90と相同性を有する。

【0007】

数年来個々のストレスタンパク質について研究されているが(例えばhsp70の上に、場合によつては集中的に研究されている)、前述のhsp及びgrp群の最大である、hsp110及びgrp170はほとんど注目されていない。両者とも、配列解析により、hsp70ファミリーの巨大かつ高度に多様な関係物を示していることをがわかつ

た。hsp70ファミリー、hsp110ファミリー、及びgrp170ファミリーは、共通の進化の起源を共有している真核細胞の3種の識別可能なストレスタンパク質群を含むことが認められた。(明らかに)全ての真核細胞の細胞質中の細胞質中のhsp70に平行したhsp110の存在及びER中のgrp78に平行したgrp170の存在は、これらとの疎遠な関係のタンパク質ファミリーの重要な他のと異なる機能について議論がある。しかし全てのストレスタンパク質が、ワクチンとして機能する機能ではなく、かつ異なるものは異なる活性を示すであろうと予想することができる。

【 0 0 0 8 】

感染症及び癌の療法に関する膨大な研究にもかわらず、これらの疾患は効率的診断及び治療に困難を留めている。従つて、当技術分野において、癌及び感染症を治療するための改善された方法が必要である。本発明は、これらが必要性を満たし、かつ更にその他の開拓した利点を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明は、ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物を提供する。このストレスタンパク質複合体は、hsp110又はgrp170又はgrp110ボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを含む。一部の態様において、hsp110又はgrp170ボリペプチドは、例えば非共有結合型相互作用により、免疫原性ボリペプチドと複合され、これは融合タンパク質を含む。一部の態様において、この複合体は感染性物質に感染した細胞に由来している。ストレスタンパク質複合体の免疫原性ボリペプチドは、癌又は感染症に関連することができる。本発明のストレスタンパク質複合体は更に、hsp70、hsp90、grp78及びgrp94ストレスタンパク質ファミリーの構成要素を含む、追加のストレスタンパク質ボリペプチドを含むことができる。ある態様において、このストレスタンパク質複合体は、hsp70及びhsp25に複合されたhsp110を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明は更に、hsp110又はgrp170ボリペプチドをコードしている第1のボリペクレオチド及び免疫原性ボリペプチドをコードしている第2のボリペクレオチド

を含有する生物学的組成物を提供する。第一及び第2のポリペプチドに関連してい
る一部の態様において、第1のポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドに連
結されている。本発明の生物学的組成物は更に、生理的に許容される担体及び／又
はアジュバントを含有することができます。効力のある生物学的組成物は更に、GM-CS
F-分泌細胞も含む。あるいは、GM-CSF-分泌細胞は、発明の生物学的組成物と同時投与するこ
とができる。GM-CSF-分泌細胞の使用は、生物学的組成物の効力を増大する。

【 0 0 1 1 】

一部の態様において、前述の複合体は、腫瘍から又は感染性物質により感染し
た細胞から精製される。このような態様において、精製されたストレスポリペプチド
チドは、1種以上の免疫原性ポリペプチドと複合されると複合体は、ストレスポリペプチド
の免疫原性ポリペプチドへの結合は、ストレス、例えば熱への曝露、無酸素状態
及び／又は虚血状態、もしくはタンパク毒素によるストレスなどにより、変更及
び／又は増強することができます。特に、本発明のストレスタンパク質複合体は、
免疫原性ポリペプチドと複合されたストレスポリペプチドを含むことができ、こ
こでこの複合体は加熱されている。このようないかが、特にストレスポリペプチ
ドが熱誘導ストレスタンパク質を含む場合に、ストレスタンパク質複合体のワク
チンとしての効力を増強する。熱誘導性ストレスタンパク質の例は、hsp70及びh
sp110を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 1 2 】

一部の態様において、免疫原性ポリペプチドが公知である。免疫原性ポリペプ
チドが公知の分子である場合、又はストレスポリペプチドとの複合体として提供するこ
とができる。hsp110又はgrp170ポリペプチドは、免疫原性ポリペプチドと、非共
有結合により複合され得る。あるいは、この複合体は、融合タンパク質を含むこ
とができる。ここでこのストレスポリペプチドの例は、癌又は感染症に関連する抗原、例えば
乳癌抗原her2/neu又はヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)抗原Mt b8.4
及びMt b39などを含むが、これらに限定されるものではない。免疫原性ポリペプ

チドが不明である場合、これは癌又は感染症の被験者の組織からのストレスボリペプチドに不隨して得ることができる。

【 0 0 1 3 】

同じく grp170又はgrp170ボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを提示するように修飾された抗原提示細胞(APC)を含有する生物学的組成物も提供される。あるいは、APCは、癌細胞及び感染性物質に感染した細胞を含む疾患細胞からのはsp110又はgrp170の精製により得られた免疫原性ボリペプチドを提示するよう修飾することができる。好ましくは、APCは、樹状細胞又はマクロファージである。APCは、ペプチド負荷及び免疫原性ボリペプチドをコードしているボリヌクレオチドによるトランスクエクションを含むが、これらに限定されるものではない様々な手段により修飾することができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の生物学的組成物は、被験者に投与することででき、これによりヒト型結核菌感染症を阻害し、腫瘍増殖を阻害し、癌の発症を阻害し、及び癌又は感染症を治療又は予防する方法が提供される。

【 0 0 1 5 】

更に本発明は、腫瘍細胞に対するT細胞を產生する方法を提供する。この方法は、T細胞を抗原提示細胞(APC)と接觸させると段階を含み、ここでAPCは、hsp110又はgrp170ボリペプチド及び腫瘍細胞に関連する免疫原性ボリペプチドを提示するよう修飾される。このようないわゆるT細胞死滅の方法において使用することができる、ここで腫瘍細胞はT細胞と接觸される。同様に本発明は、ヒト型結核菌感染細胞に対するT細胞を產生する方法を提供し、ここでT細胞は、hsp110又はgrp170ボリペプチド及びヒト型結核菌感染細胞に関連する免疫原性ボリペプチドを提示するよう修飾されたAPCと接觸される。本発明は、本方法により產生されたT細胞、並びにこのようないわゆるT細胞を含有する生物学的組成物を含む。T細胞は、ヒト型結核菌感染細胞を死滅する方法において、ヒト型結核菌感染細胞と接觸せることができる。T細胞は、CD4+又はCD8+であることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明は更に、生体試料から腫瘍細胞を除去する方法を提供する。この方法は

、生体試料を、本発明のT細胞と接觸させせる段階を含む。好ましい態様において、生体試料は、血液又はその画分である。更に、被験者において腫瘍増殖を阻害する方法も提供される。この方法は、抗原提示細胞(APC)を伴う被験者から単離されたCD4+及びCD8+T細胞をインキュベーションする段階を含み、ここでAPCは、hsp110又はgrp170がリペプチド及びペプチドにより修飾されたT細胞を増殖され、T細胞を提示するように修飾され、T細胞をインキュベーションする段階、ここでAPCは、hsp110又はgrp170がリペプチド及び腫瘍細胞に接觸する段階、ここでも1種の増殖した細胞をクローニングし、かつクローニ化されたT細胞を有効量患者に投与し、これにより被験者における腫瘍増殖を阻害することを含む。

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、ストレスタンパク質hsp110及びgrp170は、腫瘍抗原と複合された場合に、抗腫瘍ワクチンとして著しく有効であるといいう発見を基にしている。これらストレスタンパク質複合体の効力は、予防的状況及び治療的状況の両方ににおいて明らかにされている。これらのストレスタンパク質の効果的免疫応答を促進する能力の発見は、癌及び感染症の予防及び治療における使用のための様々な抗原の提示におけるそれらの用途の基本を提供している。Hsp110及びgrp170は両方とも拡大された(enlarged)ペプチド結合クレフト(peptide binding cleft)を有し、かつhsp70と比べより効果的に伸びた(unfolded)ペプチド鎖を安定化することができるので、これらの分子は、先に得られたものは異なる免疫学的反応を誘起することができる。

【 0 0 1 8 】

ストレスタンパク質hsp110及びgrp170の概略

ほとんどの細胞タンパク質の発現は、突然の温度上昇に曝された哺乳類細胞に

おいて頭著に低下されるが、熱ショックタンパク質は、これらの条件下で発現増加を示す。様々なストレッサーに反応して生じた熱ショックタンパク質は、非天然の状態(例えば、熱又は塩化グアニジン処理により)で他のタンパク質に結合する能力を有し、特にリボソームから遊離するか又は小胞体から押出されているような新生ペプチドに結合する能力を有する(Hendrick及びHartl、Ann. Rev. Bioc hem.、62:349-384(1993); Hartl、Nature、381:571-580(1996))。熱ショックタンパク質は更に、細胞質、小胞体及びミトコントリア内のタンパク質の適切なフルデイニング及び集成における重要な役割を意味するシャペロン機能に役立つことも示されている(Frydmanら、Nature、370:111-117(1994))。

【 0 0 1 9 】

哺乳類の熱ショックタンパク質ファミリーは、hsp28、hsp70、hsp90及びhsp110を含む。これらの中の主な熱ショックタンパク質は、細胞質において発見されており、かつつより少ない量が核において発見されている。ストレスタンパク質の別のセットで、グルコース調節タンパク質(grp)として知られているものは、小胞体中に存在する。グルコース調節タンパク質の主要ファミリーは、grp78、grp74、grp170を含む。この範疇のストレスタンパク質は、それらのプロモーター中に、熱ショック要素を欠いており、かつ熱により誘導されないが、他のストレス条件、例えば無酸素症などにより誘導される。

【 0 0 2 0 】

Hsp110は、豊富かつ強力な誘導可能な哺乳類の熱ショックタンパク質である。ヒトhsp110は、KIAA0201、NY-CO-25、HSP105 α 及びHSP105 β としても公知である。マウスのhsp110も、HSP105 α 、HSP105 β 、42°C特異性熱ショックタンパク質、及びhsp-E71として公知である。Hsp110は、hsp70と比べてより大きいサイズ及び異なる結合親和性を有するペプチドに結合することが可能な、ATP結合 β シート領域及び α ヘリックス領域を有する。Hsp110は、より短いペプチド(12mer)に結合する事が示されており、かつhsp110への結合のための好ましいコンセンサスマチーフが決定されている(すなわち、塩基性、極性、芳香族性／塩基性、プロリン、塩基性、酸性、芳香族性、芳香族性、塩基性、芳香族性、芳香族性/X(優先的でない)、塩基性/芳香族性)。この配列は、hsp70ファミリーの構成

要員に結合するために先に同定された好ましい配列モチーフとは異なる。

【0021】

Hsp110は、hsp70と比べて、より効率的に熱変性されたタンパク質を安定化し、これは等モルペースで4倍以上の効率である。Hsp70及びhsp110のペプチド結合特性は、これらを、変性したペプチド鎖への結合により変性したタンパク質が凝集することを阻害する上で効果的なものにしている。熱及び塩化グアニシン曝露の2種の異なる変性条件を用いると、hsp110は、ルシフエラーゼ及びケエン酸シンターゼが1:1のモル比で存在する場合のこれらの凝集の阻害において、ほとんど全ての効力を示している。Hsp70ファミリーの構成要員は、同様の機能を発揮するが、顕著に低い効率である。

【0022】

Grp170は、小胞体に存在するhsp110に対する強力な構造ホモログである(Linら、Mol. Biol. Cell、4:1109-119(1993)；Chenら、FEBS Lett. 380:68-72(1996))。Grp170は、hsp110と同じ二次構造の特徴を示し、これは拡大されたペプチド結合ドメインを含む。Grp170は、その中心近傍に β シートドメインを、よりC末端側に α -ヘリックスドメインを、及び両方に連結しているhsp110に存在するループドメインよりもはるかに長いループドメイン(アミノ酸長200個対アミノ酸長100個)を含み、かつDnakは存在しないことが予想される。加えて、grp170は恐らくタンパク質の哺乳類小胞体への輸送に必要な重要な重要なATPaseである(Dierksら、EMBO J.、15:6931-42(1996))。Grp170は、ORP150(ヒト及びラットの両方で同定された酸素-調節タンパク質)及びCBP-140(マウスにおいて同定されたカルシウム結合タンパク質)としても公知である。Grp170は更に、hsp70よりも、変性タンパク質をより効率的に安定化することが示されている。

【0023】

ワクチンとしてgrp170及びhsp110の両方が機能するという本明細書に記された発見は、これまで利用できる戦略よりも、癌及び感染症の治療及び予防における使用のための、新規及びより効果的なワクチンの可能性を提供する。

【0024】

本明細書において使用された全ての科学用語及び技術用語は、特に記さない限りは、当技術分野において通常使用される意味を有する。本明細書において使用される場合に、下記の単語及び句は、特定の意味を有する。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用される「ボリベブチド」とは、天然の給源から単離された、組換え技術により作出された又は化学的に合成されたかに関わらず、タンパク質、タンパク質断片、及びペプチドを含む。本発明のボリベブチドは典型的には、少なくとも約6個のアミノ酸を含む。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される「ベクター」とは、対象となる1種以上の遺伝子又は配列を宿主細胞へ送達し、かつ好ましくは発現する事が可能である、構築物を意味する。ベクターの例は、ウイルスベクター、裸のDNA又はRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性縮合剤に会合されたDNA又はRNAの発現ベクター、リボソームに封入されたDNA又はRNA発現ベクター、及びある種の真核細胞、例えばブロデューサー細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される「発現調節配列」とは、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現調節配列は、構成的又は誘導性プロモーターのようないモーター、又はエンハンサーであることができる。発現調節配列は転写される核酸配列に機能的に連結される。

【 0 0 2 8 】

「核酸」又は「ボリヌクレオチド」という用語は、1本鎖又は2本鎖の形状のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドボリマーチを意味し、かつ特に記さない限りは、核酸に天然のヌクレオチドと同様の方法でハイブリダイズする天然のヌクレオチドの公知の類似体を包含している。

【 0 0 2 9 】

本明細書において使用される「抗原提示細胞」又は「APC」とは、抗原の操作及びリンパ球への提示が可能な細胞を意味する。APCの例は、マクロファージ、

ランゲルハンス-樹状細胞、濾胞性樹状細胞、B細胞、單球、纖維芽細胞、及び纖維細胞を含むが、これらに限定されるものではない。樹状細胞は、抗原提示細胞の好ましい型である。樹状細胞は、多くの非リンパ系組織において発見されていながら、輸入リンパ又は血流を介してリンパ系臓器のT細胞-依存領域へ移動するこことがある。非リンパ系臓器において、樹状細胞は、ランゲルハンス細胞及び間質性樹状細胞を含む。リンパ及び血液において、これらは各自、輸入リンパ中のペール細胞及び血液樹状細胞を含む。リンパ系臓器において、これらはリンパ系樹状細胞及び指状嵌入細胞を含む。

【 0030】

本明細書において使用されるエビトープを提示するように「修飾された」とは、天然又は組換え法によりエビトープを提示するように操作される抗原提示細胞(APC)を意味する。例えば、APCは、ペプチド負荷の、単独又は混合物の一部としての、単離された抗原への曝露により、もしくは1種以上のエビトープを含むがリペプチドを発現するためのAPCの遺伝的修飾により、修飾することができること。

【 0031】

本明細書において使用される「腫瘍タック質」とは、腫瘍細胞により発現されるタンパク質である。腫瘍タック質であるタンパク質は、免疫アッセイ法(ELISAなど)において、癌患者由来の抗血清と、検出できるように対応することもできる。

【 0032】

本明細書において使用される「熱誘導性ストレスポリペプチド」とは、上昇した温度によりその発現が誘導されるようなストレスポリペプチド又はタンパク質を意味する。熱誘導性ストレスポリペプチドの一例は、そのプロモータ内に1種以上の熱ショックエレメントを含むストレスタンパク質を含む。

【 0033】

本明細書において「免疫原性ポリペプチド」とは、B細胞及び/又はT細胞表面抗原受容体により認識される(すなわち特異的に結合される)タンパク質の一部である。このようないくつかの免疫原性ポリペプチドは、一般に癌又は感染症に関連するタンパク質の少なくとも5個のアミノ酸残基を含み、より好ましくは少なくとも10

個の、及び更により好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基を含む。ある好ましい免疫原性ボリペプチドは、N末端リーダー配列及びノーステム質通過ドメインが欠失しているようないべブチドを含む。他の好ましい免疫原性ボリペプチドは、成熟タンパク質に比べ、小さいN末端及びノーステム端欠失(例えば、1~30個のアミノ酸、好ましくは5~15個のアミノ酸)を含むことがある。

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」とは、活性成分と組合わせた場合に、成分の生物学的活性を保持しがかつ被験者の免疫系と反応しない、ような物質のいすれかを含む。例として、標準の薬学的担体、例えばリソ酸緩衝生理食塩水、水など、油/水乳剤のような乳剤、及び様々な種類の湿润剤があるが、これらに限定されるものではない。エアゾール及び非経口投与のための好ましい着色剤は、リソ酸緩衝生理食塩水又は通常の(0.9%)生理食塩水である。

【 0 0 3 5 】

このような担体を含有する組成物は、周知の従来の方法により製剤される(例えば、レミントン(Remington)「薬科学(Pharmaceutical Science)」、第43章、14版、Mack Publishing社、イーストシ、PA、18042、USAを参照のこと)。

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される「アジュバント」とは、免疫応答を促進するために当技術分野において通常使用されるアジュバントを含む。アジュバントの例は、ヘルパーペプチド；アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムグель(アルム)又はリソ酸アルミニウムなど；フロイントの不完全アジュバント及び完全アジュバント(Difco Laboratories社、デトロイト、MI)；メルクアジュバント65(Merck社、ローウェイ、NJ)；AS-2(Smith-Kline Beecham社)；QS-21(Aquilla Biopharmaceutical社)；MPL又は3d-MPL(Corixa社、ハミルトン、MT)；LEIF；カルシウム、鉄、又は重鉛の塩；アシル化されたチロシンの不溶性懸濁液；アシル化された糖質；カチオン性又はアニオニ性誘導された多糖；ボリホスファゼン；生分解性ミクロスフェア；モノホスホリリビドA及びクイールA；ムラミルトリペプチドホスファチジルエタノールアルミニン、又はサイトカインを含む免疫賦活複合体(例えば、GM-CSF又はインターロイキン-2、-7もしくは-12)、及び免疫賦活性DNA配列

である。一部の態様において、ポリヌクレオチドワクチンの使用同様、ヘルバーベプチド又はサイトカイシンのようなアジュバントが、アシュバントをコードしているポリヌクレオチドを介して提供され得る。

【 0 0 3 7 】

本明細書において「1つの(a)」又は「1つの(an)」とは、特に明確に指示しない限りは、少なくとも1個を意味する。

【 0 0 3 8 】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は、hsp110又はgp170のような1種以上のストレスタンパク質、又はそれらの一部もしくは他の変種をコードしている第1のポリヌクレオチド、並びに1種以上の免疫原性ポリペプチド、又はそれらの一部もしくは他の変種をコードしていいる第2のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドを提供する。一部の態様において、これら的第一及び第2のポリヌクレオチドは連結され、ストレスタンパク質複合体をコードししている単独のポリヌクレオチドを形成する。この単独のポリヌクレオチドは、様々な方法で第一及び第2のタンパク質を発現することができる、例えば、単独の融合タンパク質として又は複合体を形成することが可能であるような2種の個別の中タンパク質としてである。

【 0 0 3 9 】

好みしいポリヌクレオチドは、ストレスタンパク質又は免疫原性ポリペプチドの一部をコードしている、少なくとも15個の連続ヌクレオチド、好みくは少なくとも30個の連続ヌクレオチド、及びより好みくは少なくとも45個の連続ヌクレオチドを含む。より好みくは、第1のポリヌクレオチドは、ストレスタンパク質のペプチド結合部分をコードし、かつ第2のポリヌクレオチドは、免疫原性ポリペプチドの免疫原性部分をコードしている。このような配列のいすれかに相補的であるポリヌクレオチドも、本発明に包含される。RNA分子は、1本鎖(コード又はアンチセンス)もしくは2本鎖であることができる。RNA分子は、かつDNA(ゲノム、cDNA又は合成)又はRNA分子であることができる。RNA分子は、イントロンを含みかつ1対1の方法でDNA分子に対応しているようなHnRNA分子、並びにイントロンを含まないmRNA分子を含む。追加のコード又は非コード配列は、本発明のボリ

ヌクレオチド内に存在することができるが、必ずしもではなく、かつボリヌクレオチドは、他の分子及び／又は支持物質に連結することができますが、必ずしもではない。

【 0 0 4 0 】

ボリヌクレオチドは、天然の配列(すなわち、ストレスタンパク質、免疫原性ボリペプチド又はそれらの一部をコードしている内因性配列)を含むことをができる、もしくはこのようないくつかの変種を含むことができる。ボリヌクレオチド変種は、1個以上の置換、付加、欠失及び／又は挿入を含み、その結果コードされたボリペプチドの免疫原性が、天然のストレスタンパク質に比して減弱されるることはない。コードされたボリペプチドの免疫原性に対する作用は、一般に本明細書に記されたように評価することができる。変種は、天然のストレスタンパク質又はその一部をコードしていいるボリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくとも約70%の同一性を、より好ましくは少なくとも約80%の同一性を及び最も好ましくは少なくとも約90%の同一性を示す。

【 0 0 4 1 】

2種のボリヌクレオチド又はペプチド配列は、以下に説明するように対応が最大になるように並べた場合に、これら2種の配列の中のヌクレオチド又はアミノ酸配列が同じである場合に、「同一」であると称される。2個の配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局部領域を同定しかつ比較するための比較ウインドウは、少なくとも約20個の、通常は30～約75個の、40～約50個の連続位置のセグメントを意味し、ここで配列は、2個の配列が最適に並べられた後、同じ番号の連続位置の参照位置と比較され得る。

【 0 0 4 2 】

比較のための最適な配列アライメントは、Lasergeneの生体情報学統合ソフトウェア (DNASTAR社、マジソン、WI)において、Megalianプログラムを用い、デフォルトのパラメータで行うことができる。このプログラムは、下記の参考文献において説明された、いくつかのアライメント方式を具体化している：Dayhoff, M. O., (1978)、「タンパク質の進化的変化モデル-連縁の検出マトリックス」

; Dayhoff, M. O. (編集)、タンパク質配列及び構造のアトラス、National Biomedical Research Foundation、ワシントンDC、第5巻補遺3、345-358頁；Hein J.、(1990)、「アライメント及び系統学のための統一法」、626-645頁、Methods in Enzymology、第183巻、Academic Press社、サンディエゴ、CA；Higgins, D. G. 及び Sharp, P. M.、(1989)、CABIOS、5:151-153；Myers, E. W. 及び Muller W.、(1988)、CABIOS、4:11-17；Robinson, E. D. (1971)、Comb. Theor.、11:105；Santosu, N.、Nes, M.、(1987)、Mol. Biol. Evol.、4:406-425；Sneath, P. H. A. 及び Sokal, R. R.、(1973)、Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy、Freeman Press、サンフランシスコ、CA；Willbur, W. J. 及び Lipman D. J.、(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:726-730)。

【0043】

好みしくは、「配列同一性の割合(%)」は、2個の最適に並べた配列を少なくとも20位の比較ウインドウ内でのボリュームオーチド又はボリペプチド配列の一部は、これら2個の配列の最適アライメントにおいて、参照配列(これには付加又は欠失を含まない)と比較して、20%以下、通常5~15%、又は10~12%の付加又は欠失(すなわちギャップ)を含むことができる。この割合は、合致した位置の数を得るために、両方の配列において同じ核酸塩基又はアミノ酸残基が生じるような位置の数を決定し、合致した位置の数を参照配列の位置の総数(すなわちウインドウサイズ)で割り、かつこの結果に100を掛け、配列同一性のパーセントを得ることにより算出される。

【0044】

麥種は更に、又はあるいは、天然の遺伝子、又はそれらの一部もしくは相補体と実質的に相同であることができる。このようなボリュームオーチド配列は、天然のストレスタンパク質をコードしている天然のDNA配列(又は相補配列)に生じる中程度のストリニジエンント条件で、ハイブリダイズする事が可能である。適当な中等度のストリニジエンント条件は、5XSSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA(pH 8.0)の溶液中の予備洗浄；50~65°Cでの、5XSSC、一晩のハイブリダイゼーション；それに続く、各々、0.1% SDSを含有する、2X、0.5X及び0.2X SSCによる、65°C

、20分間の洗浄2回を含む。

【0045】

当業者には、遺伝暗号の結果として、本明細書に記されたボリペプチドをコードしている多くのスクレオチド配列が存在することは理解されると思われる。このようなボリスクレオチドの一部は、天然の遺伝子のスクレオチド配列に対しても最小の相同性を生じる。しかしながら、コドン用法の差異のために変動するボリスクレオチドは、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、スクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子の欠失、付加及びノーバス置換などの、1種以上の変異の結果変動する内因性遺伝子である。得られるmRNA及びタンパク質は、変更された構造又は機能を有するが、必ずしもではない。対立遺伝子は、標準技術を用いて同定することができます(例えば、ハイブリダイゼーション、増幅及びノーバスデータベースの配列比較)。

【0046】

ボリスクレオチドは、当技術分野において公知の様々な技術のいずれかを用いて調製することができます。ストレスタンパク質をコードしているDNAは、ストレスタンパク質mRNAを発現していいる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従つて、ヒトhspl10又はgrp170 DNAは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができます。ストレスタンパク質コードしている遺伝子も、ゲノムライブラリー又はオリゴヌクレオチド合成から得ることができる。ライブラリーは、対象となる遺伝子又はそれによりコードされたタンパク質を同定するためにデザインされたプローブ(例えば、ストレスタンパク質に対する抗体又は少なくとも約20~80塩基のオリゴヌクレオチドなど)でスクリーニングすることができます。具体的なライブラリーは、ヒト肝cDNAライブラリー(ヒト肝5'-伸長cDNA、Clontech Laboratories社)及びマウス腎cDNAライブラリー(マウス腎5'-伸長cDNA、Clontech Laboratories社)を含む。選択されたプロープによるcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることは、Sambrookらの著書(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (ニューヨーク、Cold Spring Harbor Laboratory Press社、1989))に記された方法のような、常法を用いて

行うことをができる。hap110又はgrp170をコードしている遺伝子を単離する別の手段を、PCR法に使用することができる(Sambrookら、前掲；Dieffenbachら、PCR Primer : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press社、1995)。

【 0 0 4 7 】

プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さ及び偽陽性を最小にするために十分に曖昧でないものでなければならない。オリゴヌクレオチドは好ましくは、スクリーニングされるライプラリ一内のDNAへのハイブリダイゼーション時に検出することができます。標識法は、当技術分野において周知であり、かつ^{3'}P-標識されたATPのような放射標識、ビオチン化又は酵素標識の使用を含む。中等度のストリシエーション条件は、Sambrookらの著書(前掲)に提供されている。

【 0 0 4 8 】

このようなライプラリースクリーニング法で同定された配列は、寄託された別の公知の配列及びGenBank又は他のライバースのデータベースのように公開されたデータベース入手することができます。配列と比較されかつかが可能である。分子の限定された領域内又は完全長配列に及ぶ配列同一性(アミノ酸又はヌクレオチドのいづれかのレベル)は、相同性を測定するために様々なアルゴリズムを使用する、コンピュータソフトウェアプログラムを用いる配列アライメントを通じて決定することができます。

【 0 0 4 9 】

タンパク質コード配列を有する核酸分子は、選択されたcDNAライブライマー又はゲノムライプラリ一をスクリーニングすることにより、かつ必要ならば、Sambrookら(前掲)に記された通常のライマーマー伸長法を用い、cDNAに逆転写されていないmRNAの前駆体及びプロセシング中間体を検出することにより得ることができる。

【 0 0 5 0 】

オリヌクレオチド変種は一般に、例えば固相ホスホロアミダイト化合成など

による化学合成を含む當技術分野において公知のいづれかの方法により調製することができる。更にボリヌクレオチド配列の修飾は、オリゴヌクレオチド位置指定突然変異誘発のようないくつかの標準の突然変異誘発技術を用いて導入するごともできる(Adelmanら、DNA、2:183(1983)を参照)。あるいは、DNAが適当なRNAポリメラーゼプロモーター(T7又はSP6など)と共にベクターに組入れられているならば、RNA分子は、ストレスタンパク質又はその一部をコードしているDNA配列のインビトロ又はインビト転写により作製することができます。ある種のタンパク質は、本明細書に記されたよろんな、コードされたボリペプチドを調製するためには、本とができる。加えて、あるいは代わりに一部を患者に投与することができます、その結果そのコードされたボリペプチドがインビトにおいて作出される(例えば、ストレスボリペプチドコードコートransfectedがcDNA構築物による、樹状細胞のようないくつかの抗原提示細胞のトランスフェクション、及びトランスフェクション、及びトランスフエクション、及びトランスフエクション、及びトランスフエクションへの投与)。

【 0 0 5 1 】

ボリヌクレオチドを、インビトにおける安定性を増大するように更に修飾してもよい。可能性のある修飾は、5'及びノース3'末端へのフランキング配列の付加；主鎖におけるホスホジエステル結合(phosphodiesterase linkage)の代わりのホスホロチオエート又は2'-0-メチルの使用；及びノシン、クエオシン(queosin)、及びウイブトシン(wybutosin)のような従来型でない塩基に加え、アデニン、シチシン、グアニン、チミジン及びウリジンのアセチル、メチル、チオ-及びその他の修飾された形の封入を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 5 2 】

ヌクレオチド配列は、確立された組換えDNA技術を用いて、様々な他のヌクレオチド配列と一緒ににすることができる。例えば、ボリヌクレオチドは、プラスミド、ファーナシミド、ラムダファーナシジン及びコスミドを含む、様々なクローニングベクターのいづれかにクローニングすることができます。特に対象となるベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ作製ベクター及びシーケンシングベクターを含む。概して、ベクターは、少なくとも1種の生物において機能

する複製起点、都合の良い制限エンドヌクレオチドは、望ましい用途によつて決まり、かつ当業者には自明のことであると思われる。

【 0053】

ある娘様において、ボリヌクレオチドは、哺乳類細胞への進入を可能にし、かつ当業者には、つそこでの発現を可能にするよううに製剤することができる。このような製剤は、特に下記に記すように治療目的に有用である。当業者は、標的細胞におけるボリヌクレオチドの発現を実現するには多くの方法があり、かつ必ずしも適當な方法を用いることができる。例えば、ボリヌクレオチドは、アデノウイルス、レトロウイルス、又はワクスウイルス(例えば、トリポックサベクター)などがあるが、これらに限定されるものではないようなウイルスベクターに組込むことができる。DNAのこののようなベクターへの導入技術は、当業者には周知である。レトロウイルスベクターは更に、遺伝子に、選択マークー(形質導入された細胞の同定又は選択を補助するため)及びノースベクターを標的特異性にするための特定の標的細胞上の受容体のリガンドをコードしている遺伝子のような標的部位を、導入又は組込むことができる。標的化は、当業者に公知の方法により抗体を用い表現することもできる。

【 0054】

治療目的の他の製剤は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスфер、ビーズ、並びに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセル及びリボソームを含む脂質ベーツのシステムのような、コロイド分散システムを含む。インビビオシステム送達ビヒクルとしての用途に好ましいコロイドシステムは、リボソーム(すなわち、人工膜小胞)である。このよ的なシステムの調製及び使用は、当技術分野において周知である。

【 0055】

ストレスボリペプチド及び免疫原性ボリペプチド

本発明の状況において、ストレスボリペプチド及びストレスタンパク質及びノースは彼らの変種のペプチドなくとも hsp110 及びノースは grp170 タンパク質及びノースはそれらの変種のペプチド

結合部分を含む。本明細書に記されたよなボリペプチドは、いかなる長さであつてもよい。天然のタンパク質及び／又は異種配列由來の追加の配列が存在することができる、かつこのようないくつかの配列は、異なるペプチド結合、免疫原性又は抗原性特性を有するが、必ずしもではない。一部の態様において、ストレスボリペプチドは更に、hsp70、hsp90、grp78及びgrp94ストレスタンパク質ファミリーの構成要員の全て又は一部を含む。

【 0 0 5 6 】

Hsp110のシャペロン化活性及びペプチド結合活性を媒介することが可能であるよなhsp110の機能ドメイドン及び変種は、0h、HJらにより (J. Biol. Chem., 274 (22): 15712-18 (1999)) 同定されている。Grp170の機能ドメイドンは、hsp110のものに相似している。本明細書に記されたストレスボリペプチドの候補断片及び変種は、熱-変性されたルシフエラーゼを可溶化しかつウサギの網状赤血球溶解物の存在下でルシフエラーゼを再生 (refold) するそれらの能力を評価することにより、シャペロン化活性を有することを確定することができます (Ohら、前掲)。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様において、免疫原性ボリペプチドは、癌又は前癌状態に関連している。癌に関連する免疫原性ボリペプチドの一例は、her-2/neuペプチドである (Bargmannら、Nature, 319 (6050): 226-30 (1986); Bargmannら、Cell, 45 (5): 649-57 (1986))。her-2/neuペプチドの一例は、her-2/neuの細胞内ドメイン (アミノ酸残基 676-1255; Bargmannら、前記文献参照)、her-2/neuの細胞外ドメインの p369 (E75) としても公知；

KIFGSLAFL (配列番号: 6)

)、及び her-2/neu の膜貫通領域の p546 (

VILQGLPREYV (配列番号: 5)

) を含むがこれらに限定されるものではない。別の態様において、免疫原性ボリペプチドは、感染症に関連している。感染症に関連する免疫原性ボリペプチドの

一例は、ヒト型結核菌抗原Mtb8.4(Colerら、J. Immunol.、161:(5):2356-64(1998))又はMtb39(Mtb39Aとしても公知; Dillonら、Infect. Immun.、67(6):2941-50(1999))のような、ヒト型結核菌由来の抗原である。

【 0058】

免疫原性ボリペプチドは既知のものでも未知のものでもよい。未知の免疫原性ボリペプチドは、癌又は前癌状態の被験者又は感染症の被験者の組織からのはospital 10又はgrp170の精製に付隨して得ることができる。別の様様において、免疫原性ボリペプチドは既知の抗原を含む。

【 0059】

免疫原性ボリペプチドは一般に、Paulの「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」、第4版、663-665(Lippincott-Raven Publishers社、1999)及びそこに引用された参考文献に要約されているような、周知の技術を用いて同定され得る。このような技術は、抗原特異性抗体、抗血清及び又はT細胞株又はクローンと反応する能力についてのボリペプチドのスクリーニングを含む。本明細書に使用されるように、抗血清及び抗体は、これらが特異的に抗原に結合する場合は、抗原特異性である(すなわち、これらはELISA又は他のイムノアッセイ法においてタンパク質と反応し、かつ無関係のタンパク質とは検出できない)。このような抗血清及び抗体は、周知の技術を用いて調製することができる。免疫原性ボリペプチドは、このような抗血清及び又はT細胞と、完全長ボリペプチドの反応性よりも実質的に低くはないようないいレベルで反応する(例えば、ELISA及び又はT細胞反応性アッセイ法において)ような天然のタンパク質の一部であることができる。こののような免疫原性部分は、このようないいレベルで反応するこどが可能である。このようなスクリーニングは、Harlow及びLaneの「抗体: 実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory社、1988に記されているもののような当業者に周知の方法を用いて、一般に行なうことができる。例えば、ボリペプチドは、固相支持体上に固定され、かつ患者の血清と接触され、血清中の抗体を固定されたボリペプチドに結合させる。その後未結合の血清は除去され、かつ結合された抗体は、例えば¹²⁵I-標識したプロテイシナを用い

て検出される。

【0060】

本発明のストレスタンパク質複合体は、様々な方法を用じて得ることができる。ある例において、組換えhsp110又はgrp170は、細胞物質(例えば溶解液)と混合され、ストレスボリペプチドが細胞物質内の1種以上の免疫原性ボリペプチドと結合される。このような結合は、この混合物の加熱のようなら、ストレス条件による増強又は変更することができる。別の例において、標的細胞は、以後の精製のために標識(例えばHISタグ)されているhsp110又はgrp170でトランスクエクシヨンされる。この例は、免疫原性物質の存在下で組換えストレスボリペプチドを作出する方法を提供する。更に別の例においては、熱又は他のストレス条件を用いて、ストレスボリペプチドの精製前に、標的細胞内にhsp110又はgrp170を誘導する。このストレス処理は、インシビト又は細胞培養で行うことができる。

【0061】

一部の態様において、本発明は、ストレスボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドを含有する、増強された免疫原性を有するストレスタンパク質複合体を提供し、ここで複合体は加熱されている。このように、特にストレスボリペプチドが熱誘導性ストレスタンパク質を含む場合、ストレスタンパク質複合体のワクチンとしての効力を増大することができる。熱誘導性ストレスタンパク質のは、hsp70及びhsp110を含むが、これらに限定されるものではない。ある態様において、加熱は、ストレスタンパク質複合体を含む組織を少なくともおよそ38℃の温度に曝し、かつこの温度を、例えば一度に1℃毎、望ましい加熱レベルが得られるまで、徐々に上げていくことを含む。好ましくは、組織の温度は、およそ39.5±0.5℃となる。加熱時には、組織は、インシビト又は、イシビトであるか、又は宿主環境内に位置することができる。

【0062】

本発明のストレスタンパク質複合体は、天然のストレスタンパク質の変種を含むことができる。本明細書で使用されるボリペプチド「変種」は、そのボリペプチドの免疫原性は実質的に低下されないように、1個以上の置換、欠失、附加及

び／又は挿入において天然のストレスタンパク質と異なるポリペプチドである。別の表現をすると、抗原-特異性抗血清と反応する変種の能力は、天然のタンパク質に対して増強されると、好ましくは20%未満に減少される。このような変種は、一般に前記のポリペプチド配列のひとつ修飾、及び本明細書に記されたよな抗原-特異性抗体又は抗血清による修飾されたが如きが得られる。好ましい変種は、1個以上の部分、例えばN末端リーダー配列もししくは膜貫通ドメインなどが除去されているよなものは、別的好ましくは5~15個のアミノ酸)が成熱タニパク質のN末端及び／又はC末端から除去されていいるよな変種を含む。

[0 0 6 3]

ポリペプチド変種は、同定されたポリペプチドに対して好ましくは少なくとも約 70%、より好ましくは少なくとも約 90% 及び最も好ましくは少なくとも約 95% の同一性（前述のように決定された）を示す。

[0 0 6 4]

好ましくは、麥種は、保存的置換を含む。「保存的置換」とは、アミノ酸が、同様の特性を有する別のアミノ酸と置換されるることのないポリペプチドの構造及び三次構造の極性、電荷、親水性の特徴を予想すると思われる。アミノ酸置換は一般に、残基の極性を基に行うこと溶解度、疎水性、親水性及び親水性の特性の特徴のような類似性をもつて行うことができる。例えば、負帶電したアミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含み；正帶電したアミノ酸は、リシン及びアルギニンを含み；及び、同様の親水度を有する非帶電の極性ヘッド基(polar head)を伴うアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン及びアラニン；グリシン及びバリンであります；並びに、セリシン、トレオニン、フエニルアラニン及びチロシンが、以下を含む：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2)cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；及び、(5)phe、tyr、trp、his。麥種は更に、又は代わりに、非保存的変化を含むことをもできる。好事じい雑種において、麥種

ボリペプチドは、5個以下のアミノ酸の置換、欠失又は付加により、天然の配列とは異なる。変種は更に(又は代わりに)、例えばボリペプチドの免疫原性、二次構造及び疎水親水性に対し最小の影響を及ぼすような欠失又は付加により修飾することができる。

【 0 0 6 5 】

ボリペプチドは、翻訳時又は翻訳後にタンパク質の導入を指示するようなシグナル(又はリーダー)配列をタンパク質のN末端に含むことができる。ボリペプチドは更に、ボリペプチドの合成、精製又は同定を容易にするために、リンカー又は他の配列に複合すること(例えば、poly-FEs)也可能である。例えば、ボリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に複合することができる。

【 0 0 6 6 】

ボリペプチドは、下記実施例1に記された精製技術を含む、様々な周知の技術のいずれかを用いて調製することができます。ある態様において、ストレスボリペプチド及び免疫原性ボリペプチドは、この精製技術の結果として腫瘍細胞又は病原体に感染された細胞から同時に精製される。一部の態様において、腫瘍細胞又は感染細胞は、免疫原性ボリペプチドへの結合を増強するために、精製前に、この細胞は、数時間低レベルでの加熱(39.5~40°C)又は約1~約2時間の高レベルでの加熱(およそ43°C)により、インビトロにおいてストレス処理することができます。加えて、これらの細胞は、無酸素及び/又は虚血性又はタンパク毒条件に曝露することにより、インビトロにおいてストレス処理することができる。被験者から摘出された腫瘍は、細胞が精製前にインビトロにおいて加熱されると、細胞が非ヒト細胞の存在下でスケート

【 0 0 6 7 】

一部の態様において、ボリペプチドは、組成物が授与される予定の同一被験者から精製される。これらの態様において、腫瘍又は感染細胞の数を増加することが望ましい。このような細胞のスケールアップは、インビトロ又はインビトロにおいて、例えばSCIDマウスシステムを用いて行うことができる。SCIDマウス宿主におけるヒト被験者腫瘍の増大によるように、細胞が非ヒト細胞の存在下でスケート

ルアッサプされる場合、腫瘍を浸潤しているであらうあらゆる非ヒト(例えばマウス)細胞からヒト細胞を精製するよう注意しなければならない。ボリペプチドが精製されたのと同じ被験者に組成物が授与されるようなうなこれらの人々において、hap110及びgrp170の両方の精製に加え、制限された量の出発材料の効力を最適化するための追加のボリペプチドのストレステス処理が望ましい。

【 0 0 6 8 】

前述のようにDNA配列によりコードされた組換えボリペプチドには、当業者に公知の様々な発現ベクターのいすれかを用いDNA配列から容易に調製することができる。発現は、組換えペプチドをコードをコードをコードししているDNA分子を含む発現ベクターで形質転換又はトランスクエクションされたいすれかが適当な宿主細胞において表現することができる。適当な宿主細胞は、原核生物、酵母及び高等真核生物の細胞を含む。好ましくは、使用されると宿主細胞は、大腸菌(E. coli)、酵母、昆虫細胞又は哺乳類細胞株、例えばCOS又はCHOである。組換えタンパク質又はボリペプチドを培養培地に分泌する適当な宿主ノベクターシステムから得た上清は、最初に市販のフィルターを用いて濃縮することができる。濃縮後、濃縮物を、アブニティマークターやオノン交換樹脂のような適当な精製マトリックスに適用することができます。最後に、1回以上の逆相HPLC工程を用い、組換えボリペプチドを更に精製することができます。

【 0 0 6 9 】

約100個未満のアミノ酸、及び一般には約50個未満のアミノ酸を有する一部分又は他の変種は、当業者に周知の技術を用いる合成功手段により作出することもできる。例えば、このようないすれかが成長しつつあるアミノ酸鎖に順次追加されると、Merrifield固相合成法のようないすれかを用いて合成することができます。Merrifield、J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2146(1963)を参照のこと。ボリペプチドの自動合成功能は、Perkin Elmer/Appiled BioSystems Division社(フォスター・シティ、CA)などの供給業者から市販されており、かつ製造業者の指示に従い操作することができます。

【 0 0 7 0 】

ボリペプチドは、Perkin Elmer/Applied BioSystems Division社の430Aペプチ

ド合成装置において、HPTU(O-ペニソトリアゾールN,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリニン酸)活性化によるFMOC化学を用い合成するこことができる。Gly-Cys-Gly配列は、固定された表面に結合するか、もしくはペプチドを標識する複合の方法を提供するために、ペプチドのアミノ末端に結合することができる。ペプチドの固相支持体から切断は、下記の切断混合物；トリフルオロ酢酸：エタングリオール：チオアニソール(40:1:2:2:3)を用いて行うことができる。切断の2時間後、ペプチドは、冷メチルーブルーエーテル中で沈殿することができる。その後このペプチドペレットは、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含有する水中に溶解され、かつC₁₈逆相HPLCによる精製前に凍結乾燥される。水を溶媒とするアセトニトリル(0.1%TFA含有)の0%～60%勾配を用いて、ペプチドを溶離することができる。純粋な画分の凍結乾燥後、このペプチドを、電子スプレー(electrospray)又は他の種類の質量分析法及びアミノ酸解析により、ペプチドの特徴を決定することができる。

【 0 0 7 1 】

融合タンパク質

一部の態様において、ボリペプチドは、本明細書に記されたような複数のボリペプチドを含む、又は本明細書に記されたようないも1種のボリペプチド及び無関係の配列を含む融合タンパク質である。一部の態様において、この融合タンパク質は、hsp110及びノヌはgroup10のストレスポリペプチ質より高い収量でリペプチドを含む。免疫原性ボリペプチドは、腫瘍タンパク質又は感染症に関連するタンパク質の全て又は一部を含むことができる。

【 0 0 7 2 】

追加の融合パートナーを附加することができます。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエビトープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエビトープの供給を補助することにより、免疫原性融合パートナーとして利用することができます。別の例の融合パートナーは、天然の組換えタンパク質よりより高い収量でタンパク質の発現を補助する、発現エンハンサーとして利用することができます。ある好ましい融合パートナーは、免疫原性及び発現増強性の両方の、融合パートナーである。別の融合パートナーは、タンパク質の溶解度を増大するか、又はタン

バク質が望ましい細胞内コンバートナーアイソペプチダーゼを可能にするよう選択することができる。更に別の融合パートナーは、タンパク質の精製を促進するような、アフイニティーダイタグを含む。

【 0073 】

融合タンパク質は概して、融合共役を含む役を用いて調製することがで
きる。好ましくは、融合タンパク質は、発現システムにおいて、組換えタンパク
質として発現され、非融合タンパク質に対しても上昇したレベルの產生を可能にす
る。簡単に述べると、ボリペプチド成分をコードしているDNA配列は、個別に集
成され、かつ適当な発現ベクターに連結される。あるボリペプチド成分をコード
していするDNA配列の3'末端は、ペプチドリシンカーやを伴う又は伴わずに、第2のボリ
ペプチド成分をコードしているDNA配列の5'末端に連結され、その結果これらの
配列のリードイングフレームは相内(in phase)にある。これは、両方の成分ボリ
ペプチドの生体活性を維持している単独の融合タンパク質への翻訳を可能にする
。

【 0074 】

ペプチドリシンカー配列は、第一及び第二のボリペプチド成分を、各ボリペプチ
ドの三次構造及び三次構造へのフォールディングを確実にするのに十分な距離で
隔てるために使用することができます。このようないべブチドリシンカー配列は、当技
術分野において周知の標準方法を用いて、融合タンパク質に組込まれる。適當な
ペプチドリシンカー配列は、下記の要因を基に選択することができます：(1)柔軟な
拡大された立体構造を成すそれらの能力；(2)第一及び第二のボリペプチド上で機
能性エピトープと相互作用することができることができます；それらの能力のなさ
；並びに、(3)ボリペプチド機能性エピトープと反応し得るような疎水性又は帶
電した残基の欠如。好ましいペプチドリシンカー配列は、Gly、Asn及びSer残基を
含む。他のほぼ中性的アミノ酸、例えばThr及びAlaなども、リンカーカー配列において
使用することができます。リンカーカーとして有用に利用されるアミノ酸配列は、Ma
rateaら、Gene、40:39-46(1985)；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:
8258-8262(1986)；米国特許第4,935,233号及び米国特許第4,751,180号に開示さ
れている。このリシンカー配列は一般に、長さが1～約50個のアミノ酸により形成

されている。第一及び第2のポリペプチドが、機能ドメインを分離しかつ立體配置的干渉を防ぐために使用される非必須のN末端アミノ酸領域を有する場合は、リソカ一配列を必要としない。

【 0075 】

連結されたDNA配列は、適当な転写又は翻訳の調節エレメントに機能的に連結されている。DNAの発現に寄与する調節エレメントは、第1のポリペプチドをコードしていいるDNA配列の5'側に位置する。同様に、翻訳の終結に必要な終結コドン及び転写終結シグナルは、第2のポリペプチドをコードしているDNA配列の3'側に存在する。

【 0076 】

本発明のがりペプチドを無関係の免疫原性タンパク質と共に含むような融合タンパク質も提供される。好ましくはこの免疫原性タンパク質は、記憶応答を誘起することができる。このようなタンパク質の例は、破傷風、結核及び肝炎タンパク質を含む(例えば、Stouteら、New Engl. J. Med.、336:86-91(1997)を参照のこと)。

【 0077 】

好ましい態様において、免疫原性融合パートナーは、グラム陰性菌*Haemophilus influenzae* Bの表面タンパク質であるプロテオニンDに由来する(国際公開公報第91/18926号)。好ましいプロテオニンD誘導体は、ほぼ1/3のタンパク質(例えば、最初のN末端側の100~110個のアミノ酸)を含み、かつプロテオニンD誘導体は、脂質化(lipidate)される。ある好ましい態様において、リボタンパク質D融合パートナーの最初の109個の残基はN末端に含まれ、追加の外来性T-細胞エピトープを伴うがりペプチドを提供し、かつ、大腸菌における発現レベルを増大する(従つて、発現エクサンサーゲンとして機能する)。リビド尾は、抗原の抗原提示細胞への最適な提示を確実にする。他の融合パートナーは、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質であるNS1(ヘマグルチニン)を含む。典型的には、N末端側の81個のアミノ酸が使用されるが、T-ヘルパーエピトープを含む異なる断片を使用することができる。

【 0078 】

別の様において、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして公知のタンパク質、又はその一部である(好ましくはC末端部分)。LYTAは、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に由来し、これはアミダーゼLYTAとして公知のN-アセチル-L-アラニンアミダーゼを合成する(Lyta遺伝子によりコードされる; Gene, 43:265-292(1986))。LYTAは、ペプチドグリカン主鎖中のある結合を特異的に分解する自己溶菌酵素である。LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリニンはDEARのよくな一部のコリニン類似体への親和性に寄与している。この特性は、融合タンパク質の発現に有用な大腸菌CLYTA発現プラスミドの開発に活用されている。アミノ末端にC-LYTA断片を含むハイブリッドタンパク質の精製が説明されている(Biotechnology, 10:795-798(1992)参照)。好ましい態様において、LYTAの反復部を、融合タンパク質に組込むことができる。反復部分は、残基178で始まるC末端領域に認められる。特に好ましい反復部分は、残基188~305に組込まれる。

【0079】

概して、本明細書に記されたボリペプチド(融合タンパク質を含む)及びボリヌクレオチドは単離される。「単離された」ボリペプチド又はボリヌクレオチドとは、その当初の環境から除去かれたものである。例えば、天然のタンパク質が、天然のシステムにおいて同時に存在する物質の一部又は全てから分離されている場合は、単離されている。

【0080】

好ましくは、このようなボリペプチドは、少なくとも純度約90%であり、より好ましくは少なくとも純度約95%であり、及び最も好ましくは少なくとも純度約99%である。ボリヌクレオチドは、例えば天然の環境の一部ではないベクターにクローニングされる場合に、単離されていると見なされる。

【0081】

T細胞

免疫療法用組成物は、更に、又は代わりに、免疫原性ボリペプチドに複合されたストレスタンパク質(「ストレスタンパク質複合体」)に特異的なT細胞を含むことができる。このよろうな細胞は一般に、常法を用い、インビトロ又はエクスピボにおいて調製される。例えば、T細胞は、Nexell Therapeutics社(アービン、

CA)から入手できる ISOLEX(登録商標)磁気細胞選択システム(同じく米国特許第5,536,475号参照); 又は、Pan T Cell Isolation Kit、CD4+ T Cell Isolation Kit、及びCD8+ T Cell Isolation Kitを含む、Miltenyi Biotech社のMACS細胞分離技術(同じく米国特許第5,240,856号; 米国特許第5,215,926号; 国際公開公報第89/06280号; 国際公開公報第91/16116号及び国際公開公報第92/07243号も参照)のような、市販の細胞分離システムを用い、患者の骨髓、末梢血、又は骨髓もしくは末梢血の画分から単離することができる。あるいは、T細胞は、関連する又は無関係のヒト、非ヒト哺乳類、細胞株又は培養物に由来することができる。

【 0 0 8 2 】

T細胞は、ストレスタンパク質複合体、ストレスタンパク質複合体をコードしているポリスクリオチド及びノーノ又はストレスタンパク質複合体を発現している抗原提示細胞(APC)で刺激することができる。この刺激は、ポリペプチドに特異的なT細胞の生成を可能にするような条件下及び十分な時間で行われる。ストレスペプチド又はポリヌクレオチドは、特異的T細胞の生成を促進するために、ミクロスフェアのような、送達ビヒクル内に存在することが好ましい。

【 0 0 8 3 】

T細胞がポリペプチドで被覆された又はボリペプチドをコードしている遺伝子を発現している標的細胞を殺傷するならば、このT細胞は、ストレスボリペプチドに特異的であると考えられる。T細胞特異性は、様々な標準技術のいずれかを用いて評価することができます。例えば、クロロム放出アッセイ法又は増殖アッセイ法において、溶解及びノーノ又は増殖において、陰性対照と比較して2倍以上大きい刺激指数は、T細胞特異性を示している。このようなアッセイ法は、例えばChenら、Cancer Res., 54:1065-1070(1994)に記されている。

【 0 0 8 4 】

T細胞増殖の検出は、様々な公知の技術により達成することができる。例えばT細胞増殖は、DNA合成の増加率を測定することにより検出することができます(例えば、トリチウム化されたチミジンによるT細胞培養物のパルス-標識により、及びDNAに組込まれたトリチウム化されたチミジンの量の測定により)。ストレスタンパク質複合体(100ng/ml~100μg/ml、好ましくは200ng/ml~25μg/ml)との

～7日間の接觸は、T細胞増殖の少なくとも2倍の増加を生じるはすである。前述の2～3時間の接觸は、標準のサイトカインアッセイ法を用いて測定されるようなら、T細胞の活性化を生じ、ここではサイトカイン(例えばTNF又はIFN- γ)放出レベルの2倍の増加がT細胞活性化を示している(Coliganら「免疫学最新プロトコール(Current Protocols in Immunology)」、第1巻、Wiley Interscience社、(Greene, 1998))。ストレスボリペプチド、ボリヌクレオチド又はボリペプチドがAPCへの反応により活性化されているT細胞は、CD4+及び/又はCD8+であることがある。

【 0 0 8 5 】

好ましい態様において、T細胞は、患者又は関連するもしくは無関係のドナーのいすれかに由来し、かつ刺激及び増殖後に、その患者に投与することができます。治療目的で、ストレスボリペプチド、ボリヌクレオチド又はAPCへの反応により増殖されるCD4+又はCD8+T細胞は、インビトロ又はインビボのいすれかにおいて数の上で増大することができる。インビトロにおけるこのようないすれかの増殖は、様々な方法で達成することができる。例えば、T細胞は、インターロイキン-2のようなT細胞増殖因子、及び/又はストレスタンパク質複合体を合成する刺激細胞(stimulator cell)の添加のあり又はなしで、免疫原性ボリペプチドと複合されたストレスボリペプチドに再曝露することができる。あるいは、ストレスタンパク質複合体の存在下で増殖する1種以上のT細胞は、クローニングにより数の上で増殖することができる。細胞のクローニング法は当技術分野において周知であり、かつ限定希釈法を含む。

【 0 0 8 6 】

生物学的組成物及びワクチン

本発明は、免疫原性組成物(すなわち、ワクチン)を含む生物学的組成物に混入されている、ストレスタンパク質複合体ボリペプチド、ボリヌクレオチド、T細胞及び/又は抗原提示細胞を提供する。生物学的組成物は、1種以上のこのようないすれかの化合物、及び任意に生理的に許容される担体を含有している。ワクチンは、1種以上のこのようないすれかの化合物、及び非特異的免疫応答能賦活剤として利用するアシエバントを含むことをができる。アシエバントは、外来性抗原に対する免疫応答を賦活

するいづれかの物質であることがある。アジュバントの例は、通常のアジュバント、生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ガラクチド(polylactic galactide))、免疫刺激性オリゴヌクレオチド及びボソーム(その中に化合物が混入されている; 例えばFellertonの米国特許第4,235,877号参照のこと)を含む。ワクチン調製は一般に、例えばM.F. Powell及びM.J. Newman編集「ワクチンデザイン(サブユニット及びアジュバント法)」、Plenum出版社(NY, 1995)に記されている。本発明の範囲内の薬学的組成物及びワクチンは更に、生物学的に活性又は不活性であることができるよう其他の化合物を含有することができる。例えば、他の腫瘍抗原の1種以上の免疫原性部分が、組成物又はワクチン内に、融合ボリペプチドに混入されるか又は個別な化合物としてのいづれかで、存在することができる。

【0087】

薬学的組成物又はワクチンは、前述の1種以上のボリペプチドをコードしているDNAを含むことができる、その結果ボリペプチドがインサインサイチューニングにおいて生成される。前述のように、DNAは、核酸発現システム、細菌及びウイルスの発現システムを含む、当業者に公知の様々な送達システムのいづれかの中にあることができる。多くの遺伝子送達技術が、当技術分野において周知であり、例としてRolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 15:143-198(1998)、及びそこに引用された文献に記されている。適当な核酸発現システムは、患者における発現に必要なDNAシステムを含む(適当なプロモーター及び終結シグナルなど)。細菌送達システムは、その細胞表面にボリペプチドの免疫原性部分を発現しかつそのようなエビトープを分泌する細菌(Bacillus-Calmette-Guerrinなど)の投与に関連している。

【0088】

好ましい態様において、DNAは、ウイルス発現システム(例えば、ワクチンニア又は他のボックスクウイルス、レトロウイルス、複製コンピテントウイルスの導入することができる、これらは非病原性(防御性)、複製コンピテントウイルスの使用に関連している。適当なシステムは、例えばFisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:317-321(1989); Flexnerら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 569:8

6-101(1989) ; Flexnerら、Vaccine、8:17-21(1990)；米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、及び同第5,017,487号；国際公開公報第89/01973号；米国特許第4,777,127号；英国特許第2,200,651号；欧洲特許第0,345,242号；国際公開公報第91/02805号；Berkner、Biotechniques、6:616-627(1988)；Rosenfeldら、Science、252:431-434(1991)；Kollsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:215-219(1994)；Kass-Eislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:11498-11502(1993)；Guzmanら、Circulation、88:2838-2848(1993)；及び、Guzmanら、Cir. Res.、73:1202-1207(1993)に開示されている。このような発現システムへのDNAの混入技術は、当業者には周知である。これららのDNAは更に、例えばUlmerら、Science、259:1745-1749(1993)に説明され、かつCohen、Science、259:1691-1692(1993)において検証されたように、「裸」であることができる。裸のDNAの取り込みは、細胞に効率的に輸送される、生分解性ビーズ上をDNA被覆することにより増加することができる。

【 0 0 8 9 】

当業者に公知のいづれか適当な担体を本発明の薬学的組成物において利用することができるが、担体の種類は投与様式に応じて変動するとと思われる。本発明の組成物は、例えば局所、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下又は筋肉内投与を含む、投与のいすれか適当な方法のために製剤することができます。皮下注射のような非経口投与について、担体は、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス又は緩衝液を含むことが好ましい。経口投与について、マンニトール、乳糖、デンブン、ステアリン酸マグネシウム、サツカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、及び炭酸マグネシウムのような、前述の担体又は固形担体のいすれかを使用することができます。生分解性ミクロスフェア(例えばボリラクテートポリグリコレート)も、本発明の薬学的組成物のための担体として使用することができます。適当な生分解性ミクロスフェアは、例えば米国特許第4,897,268号及び第5,075,109号に開示されている。

【 0 0 9 0 】

このような組成物は更に、緩衝液(例えば、中性に緩衝した生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロース

、又はデキストラン)、マントルール、タンパク質、ボリペプチド、又はグリシンのようないずれかを、本発明のワクチンにおいて使用することができる。ほとんどのアジュバントは、急激な代謝から抗原を保護するようデザインされた基質、例えば水酸化アルミニウム又は鉛油、及び免疫応答賦活剤、例えればリビドA、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) 又はヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のタンパク質などを含む。適当なアジュバントは市販されており、例としてフロイントの不完全アジュバント及び完全アジュバント (Difco Laboratories社、デトロイト、MI) ; メルクアジュバント 65 (Merck社、口一ウェイ、NJ) ; 水酸化アルミニウムゲル(アルム)又はリン酸アルミニウムのようアルミニウム；カルシウム、鉄又は亜鉛の塩；アル化されたチロシン、アル化された糖の不溶性懸濁液；カチオン性又はアニオニ性の多糖誘導体；ボリホスファゼン生分解性ミクロスフェア；モノノホスホリリピドA及びクイルAがある。GM-CSF又はインターロイキン2、-7又は-12のようなサイトカイニン類も、アジュバントとして使用することができる。

【 0091 】

様々なアジュバントのいすれかを、本発明のワクチンにおいて使用することができる。ほとんどのアジュバントは、急激な代謝から抗原を保護するようデザインされた基質、例えば水酸化アルミニウム又は鉛油、及び免疫応答賦活剤、例えればリビドA、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) 又はヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のタンパク質などを含む。適当なアジュバントは市販されており、例としてフロイントの不完全アジュバント及び完全アジュバント (Difco Laboratories社、デトロイト、MI) ; メルクアジュバント 65 (Merck社、口一ウェイ、NJ) ; 水酸化アルミニウムゲル(アルム)又はリン酸アルミニウムのようアルミニウム；カルシウム、鉄又は亜鉛の塩；アル化されたチロシン、アル化された糖の不溶性懸濁液；カチオン性又はアニオニ性の多糖誘導体；ボリホスファゼン生分解性ミクロスフェア；モノノホスホリリピドA及びクイルAがある。GM-CSF又はインターロイキン2、-7又は-12のようなサイトカイニン類も、アジュバントとして使用することができる。

【 0092 】

本明細書において提供されたワクチンにおいて、アジュバント組成物は、主にTh1型免疫応答を誘導するようデザインされることが多い。高レベルのTh1型サイトカイニン類(例えば、IFN- α 、IL-2及びIL-12)は、投与された抗原に対する細胞媒介型免疫応答を誘起するのに好ましい傾向がある。対照的に、高レベルのTh2型サイトカイニン類(例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びTNF- β)は、液体免疫応答を誘起するのに好ましい傾向がある。本明細書において提供されるようなワクチンの適応後、患者は、Th1-及びTh2-型応答を含む免疫応答を支持すると思われる。主に応答がTh1-型であるような好ましい態様において、Th1-型サイトカイニンのレベルは、Th2-型サイトカイニンのレベルよりもはるかに大きく増大す

ると思われる。これらの方のサイトカインのレベルは、標準アッセイ法を用い、容易に評価することができる。サイトカインファミリーの検証については、Mosmann 及びCoffman、Ann. Rev. Immunol.、7:145-173(1989)を参照のこと。

【 0 0 9 3 】

主にTh1-型応答の誘起に使用するのに好ましいアジュバントは、例えばモノノキスホリルリビドA、好まじくは3-デ-0-アシル化されたモノノホスホリルリビドA(3D-MPL)のアルミニウム塩との組合せを含む。MPLアジュバントは、Corixa社(ハミルトン、MT)から入手することができます(米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号、及び同第4,912,094号を参照のこと)。CPG-含有オリゴヌクレオチド(CPGジヌクレオチドはメチル化されていない)も、主にTh1-型応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、かつ国際公開公報第96/02555号に開示されている。別の好ましいアジュバントは、サボニン、好ましくはQS21であり、これは単独で又は他のアジュバントと併用することができます。例えば、増強されたシステムは、モノノホスホリルリビドA及びのようなサボニン誘導体の組合せ、例えば国際公開公報第94/00153号に開示されているようなQS21及び313MPLの組合せ、もしくは国際公開公報第96/33739号に開示されたQS21がコレステロールにより消滅されるようなら、余り反応によつて生成されない/reactogenic)組成物に関連する。他の好ましい製剤は、水中油型乳剤及びトコフェロールを含有している。水中油型乳剤中のQS21、3D-MPL及びトコフェロールに関連する特に効力のあるアジュバント製剤は、国際公開公報第95/17210号に開示されている。使用することができる別のアジュバントは、AS-2である(Smith-Kline Beecham社)。本明細書において提供されたあらゆるワクチンは、抗原、免疫応答賦活剤及び適当な担体又は賦形剤の組合せを生じるような周知の方法を用いて調製することができる。

【 0 0 9 4 】

本発明のストレスボリペプチドは、更にTh1-型応答を主に誘起するアジュバントとしても使用することができます。ストレスボリペプチドは、免疫原性ボリペプチド及び任意に追加のアジュバントを含む他のワクチン成分と組合せて使用することができる。

【0095】

本明細書に記した組成物は、徐放性製剤(すなわち、投与後の化合物の緩徐な放出を実現する力セル又はスボンジ型の製剤)の一部として投与することがで
きる。このようないずれかを、周知の技術を用いて調製することがで
きる。例えば経口的、経直腸的又は皮下埋植にて、周知の技術を用いて調製することがで
きる。徐放性製剤は、担体マトリックス中に分散された
及び／又は速度制御膜で周囲を取り囲むことができる。このようないずれかを、
担体は、生体適合性であり、かつ更に生分解性であり；好ましくはこの製剤
は、比較的一定レベルの有効成分の放出をもたらす。徐放性製剤内に含まれた有
効化合物の量は、移植部位、放出の速度及び期待される期間、並びに治療又は予
防される病態の性質により左右される。

【0096】

抗原提示細胞

様々な送達ビヒクルのいずれかを、生物学的組成物及びワクチンにおいて、腫瘍
細胞又は感染細胞を標的化する抗原-特異性免疫応答の成立を促進するためには使
用することができる。送達ビヒクルは、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、單
球及び効果的APCであるように操作され得る他の細胞のようないし、抗原提示細胞(AP
C)を含む。このようないし、抗原を提示する能力を増大し、T細胞応答の活性
化及び／又は維持を改善し、それ自身抗腫瘍又は抗感染作用を有し、及び／又は
受容者に免疫学的に適合できる(すなわちBLAハロタイプの合致)よう遺伝子修
飾されるが、必ずしもではない。APCは一般に、様々な生物学的液体並びに腫瘍
及び前癌組織を含む器官のいずれかから単離され、かつ自家細胞、異系細胞、同
系細胞又は異種細胞であることがで
きる。

【0097】

ある好ましい本発明の態様は、抗原提示細胞として、樹状細胞又はそれらの前
駆体を使用する。樹状細胞は、高度に効力のあるAPCであり(Banchereau及びStein
man、Nature、392:245-251(1998))、かつ予防的又は治療的抗腫瘍免疫を誘起す
るのに生理的アシュバントとして有効であることが示されている(Timmerman及び

Levy、Ann. Rev. Med.、50:507-529(1999)を参照)。一般に樹状細胞は、それらの典型的形狀を基に(インサイチューラー星状、インビトロにおいて認められる細胞質プロセシング(樹状突起))、並びに標準アッセイ法により決定されるB細胞(CD19及びCD20)、T細胞(CD3)、单球(CD14)及びナチュラルキラー細胞(CD56)の識別マーカーの欠損を基に同定することができます。樹状細胞は、当然、インビタコス体又はエクスビボにおいて樹状細胞上に通常は認められないようないよな表面受容体又はリガンドを発現するようになります。樹状細胞の操作は、かつてこのようないよな修飾された樹状細胞は、本発明により考察されている。樹状細胞の代わりに、分泌型小胞抗原-負荷した樹状細胞(いわゆるエキソソーム)は、ワクチンにおいて使用される(Zitvogelら、Nature Med.、4:594-600(1998))。

【0098】

樹状細胞及び前駆細胞は、末梢血、骨髓、腫瘍-浸潤細胞、腫瘍周辺組織-浸潤細胞、リンパ節、脾、皮膚、臍帶血又はいずれか適当な組織又は液体から得ることができる。例えば、樹状細胞は、末梢血から収集された単球培養物へ、GM-CSF、IL-4、IL-13及びノンTNF α のよなサイトカインの組合せの添加により、エクスビボにおいて分化することができます。あるいは、末梢血、臍帶血又は骨髓から収集されたCD34陽性細胞は、GM-CSF、IL-3、TNF α 、CD40リガンド、LPS、flt3リガンド及びノン樹状細胞の成熟及び増殖を誘導する他の成分の組合せの培養培地への添加により、樹状細胞に分化することができます。

【0099】

樹状細胞は、都合良く「未成熟」及び「成熟」細胞として分類され、これら2種の良く特徴付けられた表現型の間の識別の簡単な方法がある。しかし、この命名法は、全ての可能性のある分化の中間段階を排除するようには構築されない。未成熟な樹状細胞は、抗原取り込み及びプロセシングの高い能力を伴うAPCとして特徴付けられ、これはFc γ 受容体、マンノース受容体及びDEC-205マークーの高い発現に相関している。成熟表現型は典型的には、これらのマークーの比較的低い発現、しかしシクラストリ及びCD11NMC、接着分子(例えばCD40及びCD11)、並びに補助的刺激分子(例えばCD40、CD80及びCD86)のよな、T細胞活性化に寄与する細胞表面分子の高い発現により特徴付けられる。

【0100】

APCは一般に、ストレスタンパク質(又はその一部もしくは他の変種)をコードしているポリヌクレオチドによりトランクスフエクション(又はその結果ストレスタンクスフエクション)又はその免疫原性部分は細胞表面に発現される。このようないいトランクスフエクションは、エクスビボで生じ、かつ次にエクスビボする組成物又はワクチンは、本明細書に記されたように治療目的に使用することができる。あるいは、樹状細胞又は他の抗原提示細胞を標的化する遺伝子送達ベクルを、患者に投与することができる、その結果イニビボでトランクスフエクション(又はワクチン)を及ぼすエクスビボトランクスフエクションは、例えば一 般に国際公開公報第97/24447号に開示されているような技術分野において公知の技術、又はMahviら、*Immunology and Cell Biology*、5:456-460(1997)に記された遺伝子錠法を用いて実施される。樹状細胞の抗原負荷は、樹状細胞又は前駆細胞を、ストレスボリペプチド、DNA(裸の又はプラスミドベクター内)もしくはRNAと; 又は抗原を発現している組換え細菌もしくはウイルス(例えば、ワクシニア、トリポックサス、アデノウイルス又はレンチウイルスベクター)と、インキュベーションすることにより実現することができる。負荷の前に、このボリペプチドは、T細胞補助(例えば担体分子)を提供する免疫原性パートナーと共有結合的に複合することができる。あるいは、樹状細胞は、複合されていない免疫学的パートナーで、個別に又はボリペプチドの存在下でバルスすることができる。

【0101】

治療的及び予防的方法

本発明のストレスタンパク質複合体及び生物学的組成物は、被験者に投与することができる、これによりヒト型結核菌感染を阻害し、腫瘍増殖を阻害し、癌の発症を阻害し、及び癌又は感染症を治療又は予防する方法が提供される。

【0102】

処置は、予防及び治療を含む。予防又は治療は、単独の時点又は複数の時点での、単独又は複数の部位への単独直接注射(single direct injection)により実施することができる。更に投与は、複数の部位にほぼ同時にを行うことができる。

【0103】

患者又は被験者は、哺乳類、例えばヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ブタ、及びヒツジ動物を含む。被験者はヒトが好ましく、かつ癌又は疾患に罹患していくのもよい。

【0104】

一部の態様において、治療又は予防される病態は、癌又は前癌状態(例えば、過形成、形成異常、異形成)である。癌の例は、纖維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、脊索肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、偽性粘液腫、リンパ管内皮腫、滑膜腫、中皮腫、ユーアング腫、平滑筋筋腫、結腸癌、脾癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗管癌、乳頭状腺癌、乳頭状癌、囊胞腺癌、髓様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝癌、胆癌、胆管癌、絨毛上皮癌、精上皮腫、胎生期癌、ウイルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮細胞癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、脊突起膠腫、腎膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髓腫、ワルデンシュトロームマクロブリニン血症、及び巨鎖疾患を含むが、これらに限定されるものではない。

【0105】

一部の態様において、治療又は予防されるべき病態は、感染症である。感染症の例は、病原体、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫の感染症を含むが、これらに限定されるものではない。ウイルスの例は、B型又はC型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型又はII型单纯ヘルペスウイルス、牛痘、ライノウイルス、エコーウィルス、口タウウィルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、バボバウイルス、ハントウウイルス、コクサッキウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ボリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型又はII型を含むが、これらに限定されるものではない。細菌の例は、ヒト型結核菌、ミコバクテリウム、マイコプラズマ、ナイセリア及びレジオネラを含むが、これらに限定されるものではない。寄生虫の例は、リケシチア及びクラミジアを含むが、これら

に限定されるものではない。

【0106】

従つて、前述の薬学的組成物及びワクチンは、癌又は感染症の治療に使用することができる。癌は、悪性腫瘍の存在を含む、当技術分野において一般に受け入れられていて、診断することができる。薬学的組成物及びワクチンを、手術による原発性腫瘍除去及び射線療法又は放射線療法の通常の化学療法薬の投与のよろな治療の、以前又は以後に投与することができます。

【0107】

ある態様において、免疫療法は、能動免疫療法であつてよく、この場合治療は、免疫応答修飾物質(本明細書に記されたがリペプチド及びポリヌクレオチドなど)の投与が腫瘍又は感染細胞に対し反応するよう内因性宿主免疫系をインピボ刺激することに頼つてゐる。

【0108】

別の態様において、免疫療法は、受動免疫療法であつてよく、この場合治療は、抗腫瘍作用を直接又は間接に媒介することができかつか完全な宿主免疫系には必ずしも左右されないよう、確立された腫瘍免疫反応性を伴う物質(エフェクタ一細胞又は抗体など)の送達に関連している。エフェクター細胞の例は、前述のようないわゆるTリシンパ球(CD8+細胞傷害性Tリシンパ球及びCD4+Tヘルパー細胞-浸潤リシンパ球)、キラー細胞(ナチュラルキラー細胞及びリンホカイソン活性化キラ一細胞)、B細胞及び本明細書で提供されたポリペプチドを発現している抗原提示細胞(樹状細胞及びマクロファージなど)を含む。好ましい態様において、樹状細胞は、インビトロにおいて、ポリペプチドを発現するように修飾され、かつこれららの修飾されたAPCが被験者に投与される。本明細書で言及されたポリペプチドに特異的なT細胞受容体及び抗体受容体は、養子免疫療法のためには、クローニングされ、発現され、かつ他のベクター又はエフェクター細胞に導入される。本明細書に提供されたがリペプチドは、受動免疫療法のために、抗体又は抗イデオタイプ抗体の作製に使用することができる(前記及び米国特許第4,918,164号に開示)。

【0109】

エフェクター細胞は、一般に本明細書に記された上うなイニシビト口において増殖することにより養子免疫療法に十分な量を得ることができることができる。単独の抗原特異性エフェクター細胞をインビボでの抗原認識を維持しつつ数の上で数十億個に増殖する培養条件は、当技術分野において周知である。このようないニンビト口培養条件は、典型的には、抗原による間欠刺激を使用し、サイトカイン(IL-2など)及び非分割ファイダーアー細胞の存在下であることが多い。前述のように、本明細書に記された免疫反応性ポリペプチドは、免疫療法に十分な数の細胞を作製するための、抗原特異性T細胞培養物の迅速な増殖に使用することができる。

【0110】

特に、樹状細胞、マクロファージ、單球、繊維芽細胞及び／又はB細胞のようない抗原提示細胞は、当技術分野において標準技術を用い免疫反応性ポリペプチドでバルスするか、もしくは1種以上のポリヌクレオチドによりトランスクレオチドでパルスすることができる。例えば、抗原提示細胞を、組換えウイルス又は他の発現システムにおける発現の増大に適したプロモーターを有するポリヌクレオチドでトランスクレオチドでバルスすることができる。治療に使用するために培養したエフェクターアー細胞は、増殖しかつ広範に分布し、かつインビボにおいて長期間生存することができる。培養したエフェクターアー細胞は、IL-2を補充した抗原による反復刺激により、インビボ増殖し、かつかなりの数が長期間生存するよう誘導することができる(例えばCheeverら、*Immunological Reviews*、157:177(1997)参照)。

【0111】

あるいは、本明細書で言及したポリペプチドを発現しているベクターは、患者から採取された抗原提示細胞に導入され、かつ同じ患者への戻し移植のためにエクスビボにおいてコロニー増殖される。トランスクレオチドでバルスされた細胞は、当技術分野において公知の手段を用い、好ましくは静脈内、腔内、腹腔内又は腫瘍内投与により無菌型で、患者に再導入することができる。

【0112】

授与及び用量

前記組成物は、多くは生物学的に許容される担体と共に、いずれか適当な方法で投与される。本発明の状況における被験者への適当な細胞投与法を利用でき、かつ1種よりも多い経路を用いて特定の細胞組成物を投与することができますが、特定の経路が、他の経路よりもより迅速かつより効果的な反応を提供することが多い。

【0113】

患者に投与される用量は、本発明の状況において、長期にわたり患者において有益な治療反応を実現するか、もししくは感染又は感染に起因した疾患を阻害するのに十分なものでなければならぬ。従つて、組成物は、被験者は、被験者に、特異的抗原に対する効果的免疫応答を惹起するか、及びノ又は、疾患又は感染症の症状及びノ又は合併症を緩和、軽減、治療するのに十分な量で投与される。これを達成するために適した量は、「治療有効量」と定義される。

【0114】

本明細書に開示された治療用組成物の投与経路及び頻度、更には用量は、個体毎に変動し、かつ標準技術を用いて容易に確立することができる。概して、生物学的組成物及びワクチンは、注射(例えば、皮内、腫瘍内、筋肉内、静脈内、又は皮下)、点鼻(例えば、吸引)又は経口により投与することができる。好ましくは、1~10回投与量を、52週間にわたつて投与する。好ましくは、6回投与量を、1ヶ月間隔で投与し、かつその後定期的に追加免疫ワクチンが投与される。別のプロトコールが個々の患者に適していることがある。ある様様において、組成物の2回の皮内注射が10日間隔をあけて投与される。

【0115】

適当な投与量は、前述のように投与された場合に、抗腫瘍免疫応答を促進することが可能であり、かつこれは基準レベル(未治療)よりも少なくとも10~50%高いような化合物の量である。このようないずれの応答は、例えば、例えば、患者内の抗腫瘍抗体を測定するか又はインビボにおいて患者の腫瘍細胞を殺傷するこ事が可能であるような細胞溶解性エフェクター細胞のワクチン-依存型生産によりモニタリングされる。このようないわゆるワクチンは、更に、ワクチン投与された患者において、ワクチン投与されない患者と比べて、改善された臨床の転帰(例えば、より頻繁な覚解

、完全又は部分的には長期の疾患を伴わない生存)につながるようない予防的免疫応答を惹起することが可能である。概して1種以上のボリペプチドを含有する薬学的組成物及びワクチンについて、1回投与量中に存在する各ボリペプチドの量は、約100 μ g～5mg/宿主体重kgである。適当な容量は、患者のサイズによつて変動するが、典型的には約0.1mL～約5mLである。

【0116】

概して、適当な用量及び治療方式は、治療的及び／又は予防的利点を提供するのに十分な量の有効化合物を提供する。このようない反応は、治療を受けた患者において、未治療の患者よりもより改善された臨床の転帰(例えば、より頻繁な寛解、完全又は部分的に改善された疾患を伴わない生存)を確立することにより、モニタリングすることができる。腫瘍タンパク質に対する予め存在する免疫応答の増加は、一般に改善された臨床の転帰に相關している。このようない免疫応答は、一般に標準の増殖アッセイ法、細胞毒性アッセイ法又はサイトカインアッセイ法を用いて評価され、これらは治療前及び後の患者から得た試料を用いて行うことができる。

【0117】

実施例

以下の実施例は、本発明を例示するためには、ならびに当業者が本発明を製造および使用するのを助けるために示される。実施例は、それ以外の点で本発明の範囲を制限するこどのがどのようにも意図されない。

【0118】

実施例1:hsp110、grp170、およびgrp78の精製

本実施例は、hsp110およびgrp170の精製ならびにgrp78の精製の手順について述べる。この結果は、調製物の同一性および純度を裏付ける。

【0119】

材料および方法

ダニス型ホモジナイザーを用いて、5倍体積の低張緩衝液(30 mM重炭酸ナトリウム(pH7.2)、1 mM PMSF)中で、細胞ペレットまたは組織をホモジナイズした。溶解産物を4500g、次いで100,000gで遠心分離して、破壊された細胞、核、お

よび他の組織破片を除去した。上清を100,000gで2時間さらに遠心分離した。上清を、20 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、1 mM MnCl₂で予め平衡化されたコニカナバリナセフアロースビーズ(最初の材料1ml当たりカラム体積1ml)にアブライした。結合タンパク質を、15% a-D-メチルマシンノシド(a-D-MM)を含む結合緩衝液Aで溶出した。

【 O 1 2 0 】

Hsp110の精製のために、ConA-セファロースに結合しなかつた材料を、20 mM Tris-HCl(pH7.5)、200 mM NaClで平衡化されたMono Q(Pharmacia)10/10カラムにアブライした。結合タンパク質を、同じ緩衝液を用いて、500 mM 塩化ナトリウムまでの直線塩勾配(FR:3ml/分, 40% ~ 60% B/60分)により溶出した。画分を収集し、SDS-PAGEにより、次に、抗hsp110抗体を用いたイムノブロッティングにより分析した。hsp110を含むプールされた画分(270 mM ~ 300 mM)をセントリプラス(Centrifugus)(Amicon, Beverly, MA)により濃縮し、スーパーポーロース(Superose)12カラムにアブライした。タンパク質を、流速0.2 ml/分で、40 mM Tris HCl(pH8.0)、150 mM NaClにより溶出した。画分をイムノブロットおよび銀染色により検査した。

【 O 1 2 1 】

Grp170の精製のために、10% α-メチルマシンノシドにより溶出されたConA-セファロースに結合した材料を、最初に、20 mM Tris HCl(pH7.5)、150 mM NaClで平衡化されたMono Qカラムにアブライし、150~500 mM NaCl勾配により溶出した。Grp170は300 mM ~ 350 mM NaClの間で溶出された。プールされた画分を濃縮し、スーパーポーロース12カラムにアブライした。均一な grp170を含む画分を収集し、SDS-PAGEにより、次に、抗 grp170抗体を用いたイムノブロッティングにより分析した。

【 O 1 2 2 】

Grp78(Bip)の精製のために、ConA-セファロースに結合しなかつたタンパク質を、結合緩衝液B(20 mM Tris-酢酸(pH7.5)、20 mM NaCl、15 mM β-メルカプトエタノール、3 mM MgCl₂、0.5 mM PMSF)で平衡化されたADP-アガロースカラム(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)にかけた。カラムを、0.5 M NaClを含む結合緩衝液Bで洗浄し、5 mM ADPを含む緩衝液Bと共に室温で30分間インキュベートした。その後、タンパク質を同じ緩衝液(約5倍のカラム体積)で溶出した。溶出物をMono Qカラム

ラムを用いてFPLC装置で分離し、20～500mM NaCl勾配により溶出した。 grp78は、200 mMから400 mMの間に溶出された画分中に存在した。肝臓からHspまたはgrpを精製するためには、100,000g上清を、最初に、ブルーセファロース(Blue sepharose)カラム(Pharmacia)にアブライして、アルブミンを除去した。金タンパク質をプラッドフォード法(BioRad, Richmond, CA)で定量し、SDS-PAGE、次いで、Statens Gen Biotechnologies Corp.(Victoria, BC, Canada)から入手したgrp78に対する抗体を用いたイムノプロットティングにより分析した。

【 0 1 2 3 】

結果

タンパク質hsp110、grp170、およびgrp78は腫瘍および肝臓からと共に精製された。これらら3つのタンパク質の均一な調製物が得られ、イムノプロットティングによりそれぞれの抗体に認識された。タンパク質の純度をSDS-PAGEおよび銀染色により評価した(図1)。

【 0 1 2 4 】

実施例2：腫瘍拒絶アッセイ法

本実施例は、腫瘍由来hsp110およびgrp170による免疫化が腫瘍抗原投与からマウスを保護することを証明する。この結果は、予防免疫による腫瘍増殖の遅延ならびに治療的免疫化による生存期間の延長を示す。

【 0 1 2 5 】

材料および方法

BALB/cJマウス(ウイルス抗原を含まない)をジャクソン研究所(Jackson Laboratory)(Bar Harbor, ME)から入手し、ロズウェルパーク癌研究所(Roswell Park Cancer Institute)にあるマウス施設で飼育した。メチルコラントレンに由り誘発された線維肉腫(MethA)をプラモンド(Pramond)K.シリバスクヴァ(Sriavastava)博士(コネティカット大学医学部(University of Connecticut School of Medicine), Farmington, Connecticut)から入手し、毎週200万個の細胞を継代することによりBALB/cJマウスからの腹水中で維持した。

【 0 1 2 6 】

マウス(6～8週齢の雌;1群当たり5匹のマウス)をPBSで免疫化するか、または腫

もしくは肝臓に由来する様々な量の hsp110 もしくは grp170 を PBS 200 μ l に溶解して免疫化し、7 日後に追加免疫した。最後の免疫化の 7 日後、マウスの右側腹部に、 2×10^4 個の colon 26 腫瘍細胞(生存率 > 99%)を皮下注射した。colon 26 腫瘍は非常に治療抵抗性であるマウス腫瘍モデルの良い例である。他の実験において第 2 の免疫化の 7 日後にマウスを MettA 腫瘍細胞の皮内注射により抗原投与した。2 方向の径を測定することにより、腫瘍増殖をモニターした。

【 0 1 2 7 】

結果

hsp110 や grp170 によるワクチン接種の結果を、それぞれ、図 2A や図 2B に示す。PBS や grp170 または hsp110 または grp170 で免疫化されたマウスは全て急速に増殖する腫瘍を発生した。対照的に、腫瘍由来 hsp110 や grp170 で免疫化されたマウスは、著しい腫瘍増殖の遅延を示した。従つて、腫瘍タンパク質と複合体化された hsp110 または grp170 は腫瘍増殖を著しく阻害する。

【 0 1 2 8 】

この阻害効果は、腫瘍由来 hsp110 または grp170 の用量に直接依存している。(注射 1 回当たり) 20 μ g の hsp110 または grp170 で免疫化されたマウスは、colon 26 腫瘍増殖の阻害をわずかに示したが、または全く示さなかつたのにに対して、40 μ g または 60 μ g の hsp110 または grp170 で免疫化されたマウスは、ますます著しい腫瘍増殖の遅延を示した。検査をしたその日で(抗原投与の 15、21、27 日後)、40 μ g や 60 μ g の用量の hsp110 や grp170 で免疫化されたマウスにおいて、発生した腫瘍の平均体積は対照マウスのものよりも小さかった ($p < 0.01$ 、スクエアーテンント検定)。しかしながら、PBS または肝臓由來 hsp 調製物を注射された群の平均体積の差は統計的有意性に達しなかつた。

【 0 1 2 9 】

さらに多量の腫瘍細胞(50,000 個および 100,000 個)でマウスを抗原投与するとにより、さらなる腫瘍拒絶アッセイ法を行つた。同様の阻害結果が腫瘍由来 hsp110 または grp170 について得られたが、予想通り、これらは腫瘍はさらに急速に増殖した。grp170 は colon-セラムにより精製されたが、防御免疫が腫瘍に由来する grp170 調製物で免疫化されたマウスでのみ観察され、正常肝臓組

織に由来する grp170調製物で免疫化されたマウスでは観察されなかつたので、colonに上る汚染は除外することができる。

【 0 1 3 0 】

等モル量で、grp170は grp110より免疫原性があるよう見える。grp78の免疫原性も 40 μg のタンパク質を注射することにより試験したが、腫瘍増殖の遅延は観察されなかつた。この結果は、grp78には免疫原性がないか、または低いレベルでしか免疫原性がないことを示している。

【 0 1 3 1 】

これららの観察の一般性を他の系において試験するために、grp110および grp170 の免疫原性を、メチルコラントレンにより誘発された (MethA) 線維肉腫において試験した。colon26腫瘍モデルでの免疫化データに基づいて、マウスを 40 μg の grp110 または grp170 で 2 回免疫化し、皮内注射により導入された 100,000 個の MethA 細胞で抗原投与した。

【 0 1 3 2 】

図 4A～図 4C の折れ線図は、それぞれ個々の動物においておける腫瘍増殖の速度論を示す。免疫化に反応した腫瘍増殖の注目に値する個体間差が grp170 群で観察された。PBS で免疫化されたマウスは MethA 腫瘍を発生した (図 4A)。しかしながら、grp110 (図 4B) または grp170 (図 4C) で免疫化されたマウスは保護された。ほとんどの動物は初期に腫瘍を発生したが、その後、腫瘍は消失した。grp170 で免疫化されたマウスにおいて、5匹のマウスのうち 2 匹が触診可能な腫瘍を完全に発生しなかつた (図 4C)。

【 0 1 3 3 】

治療的免疫化

進行性の colon26腫瘍をまた治療モデルにおいて調べた。腫瘍細胞 (500,000 個) を側腹部に注射し、腫瘍が目に見え触診可能になつた時 (例えば、6 日目) から、マウス (1 群当たり 10 匹) に、肝臓または colon26 由來 grp110 または grp170 を 2 回 (7 日空けて) ワクチン接種した。マウスの生存を、様々な時点での腫瘍抗原投与後に生残しているマウスのパーセントとして記録した。

【 0 1 3 4 】

結果を図 3A および図 3B に示す。腫瘍由来 (autologous) の hsp110 (図 3A) または grp110 (図 3B) 調製物で処置された、腫瘍を有するマウスは、未処置マウスまたは肝臓由来 hsp110 もしくは grp110 で免疫化されたマウスと比較して、著しく長い生存期間を示した。対照動物は全て 30 日以内に死んだが、各群の約半分が 40 日まで生残し、grp110 で処置されたマウスの 20 % が 60 日まで生残した。これららの結果は腫瘍拒絶アッセイ法から得られたデータと一致し、grp110 および hsp110 が有効な抗癌ワクチンであることを再度示している。これららのデータはまた、grp110 が、等モルで、これららの 2 種類のタンパク質のうちより有効なタンパク質であるようを見えることを示している。

【 0 1 3 5 】

実施例 3: CTL アッセイ法

抗腫瘍効果の媒介に細胞性免疫が重要であるように思われるのと、腫瘍由来 hsp110 または grp110 調製物が CD8+T 細胞反応を誘発する能力を分析するために、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) アッセイ法を行つた。この結果は、腫瘍由来 hsp110 または grp110 によるワクチン接種が有効な腫瘍特異的 CTL 反応を誘発することを示す。

【 0 1 3 6 】

材料および方法

前記のようにマウスを 2 回免疫化した。第 2 の免疫化の 10 日後に脾臓を取り出し、脾細胞 (1×10^7 個) を、7 日間の免疫化に用いた放射線照射された腫瘍細胞 (5×10^5 個) との混合リンパ球腫瘍培養 (MLTC) (10 % FCS、1 % ベニシリコンストレプトマイシン、1 mM ピルビシ酸ナトリウム、および $50 \mu M$ 2-メルカプトエタノールを添加) において共培養した。次いで、脾細胞をフィコールペーク (Ficoll-Paque (Pharmacia) 密度遠心分離により精製し、エフェクター細胞として用いた。細胞により媒介される溶解を、標準的な ^{51}Cr 逆離アッセイ法を用いてインピット口で測定した。簡単に述べると、エフェクター細胞を、50:1、25:1、12.5:1、および 6.25:1 の様々なエフェクター:標的比を用いて、V底 96 ウエルプレート (Costar, Cambridge, MA) 中で 3 回繰り返して系列希釈した。標的細胞 (5×10^6 個) を、 $100 \mu \text{Ci}$ の ^{51}Cr モリ酸 [^{51}Cr] ナトリウムを用いて 37°C で 1 ~ 2 時間標識した。 ^{51}Cr で標識された腫

癌細胞(5,000個)を添加して、最終体積200μl/ウェルにした。

【 O 1 3 7 】

標的細胞と培地だけを含んでいたウェルは、それぞれ自発遊離対照または最大遊離対照として0だけを含んでいた。37℃および5%CO₂で4時間のインキュベーション後、ガラスカウントターで上清150μlの放射能を分析した。特異的溶解率(%)を以下の式：特異的溶解% = 100 × (実験による遊離 - 自発遊離)/(最大遊離 - 自発遊離)により計算した。自発遊離は最大遊離の<10%であった。

【 O 1 3 8 】

結果

図5に示すように、grp170またはhsp110の精製に用いられた腫瘍に対する腫瘍特異的細胞傷害性が観察された。しかしながら、未処置マウスからの細胞は標的細胞を溶解することができなかつた。さらに、colon26由来するhsp110またはgrp170調製物で免疫化されたマウスからの脾細胞は、colon26腫瘍に特異的な溶解を示したが、MethA腫瘍細胞に特異的な溶解を示さなかつた。同様に、MethA由来するhsp110またはgrp170は、MethAに特異的な溶解を示したが、colon26細胞に特異的な溶解を示さなかつた。これらの結果は、腫瘍由来hsp110またはgrp170によるワクチン接種が有効な腫瘍特異的CTL反応を誘発することを証明する。

【 O 1 3 9 】

実施例4：腫瘍由来タンパク質を投与された樹状細胞によるワクチン接種

本実施例は、抗原提示細胞が、hsp110またはgrp170免疫化により誘発された抗腫瘍反応において役割を果たす能力を証明する。この結果は、樹状細胞(DC)がhsp110またはgrp170シヤペロニ化ペプチド(chaperoned peptide)を提示することができることを示す。さらに、hsp110またはgrp170を授与されたDCによる免疫法がタンパク質による直接的な免疫化より有効であった。

【 O 1 4 0 】

材料および方法

骨髄を四肢の長骨から流し、塩化アンモニウムを用いて骨髄から赤血球を除去した。RPMI-10 10ml(200U/ml(=20ng/ml)マウスGM-CSF(R&D System)、10mMHE

PBS、2 mM L-グルタミン、100 μg/mlストレプトマイシン、50 mM 2-メルカプトエタノールを添加)を入れた細菌用ペトリ皿に、白血球をペトリ皿1枚あたり 2×10^6 個でプレートティングした。培地を3日毎おおよび6日目に交換した。8日目に、細胞を使用するために回収した。DC調製物の量を細胞表面マーカー分析および形態分析で特徴付けた。DC(1×10^7 /ml)に、腫瘍由来hsp110またはgrp170(200 μg)を 37°C で3時間投与した。細胞を洗浄し、腹腔内注射のためにPBSに再懸濁した(マウス1匹当たり、 10^6 個の投与されたDCをPBS 100 μlに懸濁した)。全ての工程を10日後に繰り返した(処置マウス1匹当たり合計2回の免疫化)。第2の免疫化の10日後、マウスをcolon26腫瘍細胞(2×10^4 個)で抗原投与した。

【 O 1 4 1 】

結果

PBSまたは樹状細胞のみを与えたマウスにおいて腫瘍は進行性で増殖した(図6)。しかしながら、腫瘍由来hsp110またはgrp170を投与されたDCで免疫化されたマウスにおいて、腫瘍増殖の著しい遅延が観察された。これららの結果は、hsp110またはgrp170による直接的な免疫化の研究と一致している。タンパク質による直接的な免疫化(タンパク質40 μgの2回の皮下注射)と、投与されたDC(タンパク質20 μgを投与された 10^6 個のDC)による免疫化を比較すると、投与されたDCに基づく免疫療法は、直接的な免疫化に基づく免疫療法より有効であり、かつ少ないタンパク質を用いたので、より効率的であることが示唆される。

【 O 1 4 2 】

実施例5: 热処置によるより有効なワクチンの產生

本実施例は、熱処置された腫瘍から精製されたストレスタンパク質が、熱処置されていなない腫瘍から精製されたストレスタンパク質より、腫瘍サイズの減少にさらに有効であることを証明する。この効力の増大は、高温でのペプチド結合の改善、ならびに他の熱により誘導される変化を反映している可能性がある。

【 O 1 4 3 】

最初に、マウスの側腹部に、100,000個のcolon26腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍が約1/cmのサイズに達した後、以前に述べられたようにWBHを行った。簡単に述べると、マウスを、餌、床敷、および水を備える38℃に予め温めたマイクロア

イソレーターに入れた。次いで、予め温めた新鮮な空気が入つてくる重力対流オーブン(gravity convection oven)(MemmertモデルBE500, East Troy, WI)にケージを入れた。39.5°C(±0.5°C)の核心温度に達するまで、体温を30分毎に1°C徐々に上げた。マウスを6時間オーブン内で維持した。マウスの核心温度を、Electric laboratory Animal Monitoring system Pocket Scanner(Maywood, NJ)を用いてモニターした。hsp110、grp170、およびhsp70を精製するたために、翌日、腫瘍を取り出した。免疫化を、前記のように、1週間置いて2回、PBS、40μgの腫瘍由来hsp110、40μgのWBH処置腫瘍由来hsp110、40μgの腫瘍由来grp170、40μgのWBH処置腫瘍由来grp170、40μgの腫瘍由来hsp70、または40μgのWBH処置腫瘍由来hsp70を用いて行った。次いで、マウスを、20,000個のcolon26腫瘍生細胞で抗原投与した。腫瘍体積(mm³)を、腫瘍抗原投与の0、3、6、9、12、15、18、および21日後に測定した。

【 0 1 4 4 】

結果を図7に示す。腫瘍抗原投与の12日後および15日後で、hsp110およびhsp70で処置された群は両方とも、PBS処置マウスと比較して著しく減少した腫瘍体積を示した。腫瘍抗原投与の15日後までに、WBH処置腫瘍から精製されたhsp110またはhsp70は、熱処置されていない腫瘍から精製されたhsp110またはhsp70と比較して、腫瘍体積の減少に著しく有効であった。しかししながら、15日までに、熱処置されていない腫瘍から精製されたgrp170は、WBH処置腫瘍からのgrp170より有効であった。

【 0 1 4 5 】

これらの中では、発熱様の暴露が、colon26腫瘍から精製されたこれら2種類の(熱誘導性)hspの抗原提示経路およびノマタはペプチド結合特性に影響を及ぼすが、熱不感受性grpについては影響を及ぼさない可能性があることを示す。従つて、hsp70およびhsp110のワクチン能力は発熱レベルの治療後に著しく高まる。このことは、プロテオソーム活性の上昇、hspのペプチド結合の強化、hspに結合するタンパク質の範囲の変化、または他の要因に起因する可能性がある。hspは8時間のハイパー瑟ミア暴露の16時間後に精製されたので、この効果は37°Cでしばらく維持される。この免疫原性強化につながる要因は、hsp結合ペプチドの抗

原性プロフィールの変化および/または強化に由来する可能性が高い。ハイパー⁻サーミア出現後の安定性は、その後に長時間なお存在する、抗原処理における上流変化(例えば、プロテオソーム活性の刺激)を示唆している。発熱様ハイパー⁻サーミアの別の特徴は、colon26腫瘍における非常に著しいhsp誘導である。従つて、調べられたhspの場合、発熱様の加熱はより効率的なワクチンをもたらすだけではなく、よりに多くのワクチンをもたらす。最後に、ハイパー⁻サーミアに起因する観察されたワクチン効率の上昇がhsp110およびhsc70にだけ見られたことは興味深い。別組のストレス条件(例えば、酸素欠乏および他の還元状態)により調節されるが、熱により調節されないgrp170は、熱によつてそのワクチン能力が減少する。

【 0 1 4 6 】

これららの観察に加えて、図7に示すデータは、加熱されていない对照腫瘍(マウス)から精製されたgrp170が、等質量でhsp70またはhsp110(加熱なし)と比較した場合、ワクチン効率において著しく効率的であることを示している。この、hsp110と比較して増大したgrp170の効率はまた前記の研究に反映されている。この比較は、等質量のこれららのタンパク質の投与に基づいており、分子サイズを考慮に入れた場合(すなわち、モルで比較を行つた場合)、増大したgrp170の効率はさらに悪化する。第3に、ここで、hsp70は、ワクチン効率が(もう一度、等モルではなく等質量で) hsp110とほぼ等しいよう見える。

【 0 1 4 7 】

実施例6：grp170およびHsp110のシャペロン活性

本実施例は、タンパク質凝集アッセイ法により、grp170およびhsp110がタンパク質のシャペロンとなり、凝集を妨げることができることを証明する。この結果は、hsp70について証明された効率(0h)ら, 1997, J. Biol. Chem. 272: 31636-31640)と比較して、増大したgrp170およびhsp110の効率を示す。

【 0 1 4 8 】

レポータータンパク質であるホタルルシフエラーゼの存在下で熱処理をした際に得られる光散乱の増加の抑制により、熱処理により誘導されるタンパク質凝集を妨げるストレス条件の能力を評価した。ルシフエラーゼを、等モル量の

hsp110またはgrp170と共に43℃で30分間インキュベートした。320nmでの光学密度の増加を測定することにより、凝集をモニターした。単独で加熱されたルシフェラーゼの光学密度を100%に設定した。

【 0 1 4 9 】

結果を図8に示す。ルシフェラーゼを単独で観察された100%の凝集と比較して、ルシフェラーゼと1:1モル比のhsp110は凝集を約20%まで抑えた。これらは、ルシフェラーゼと1:1モル比のgrp170は約40%の凝集をもたらした。これらは、オーラ, 1997, J. Biol. Chem. 272: 31636-31640により用いられた条件と同じ条件である。従って、grp170およびhsp110は、タンパク質結合および凝集阻止においてhsp70より大きな効率を示す。hsp110のループドメインを欠失させた研究(オーラ, 1999, J. Biol. Chem. 272(22): 15712-15718)に基づいて、このシャベロン活性効率の増大は、hsp110およびgrp170の両方に見出される、より大きなループドメインに起因する可能性が高い。

【 0 1 5 0 】

hsp110およびgrp170は両方ともペプチド結合クリフトを示すようと思われる。しかしながら、hsp110およびgrp170はそのC末端ドメインがhsp70とは劇的に異なる。hsp70タンパク質の場合、C末端ドメインはペプチド結合クリフトの蓋として機能するらしく、結合ペプチドノタんぱく質の性質およびノマタは会合ペプチド/タンパク質に対する親和性に重大な影響を及ぼす可能性がある。hsp110およびgrp170は両方とも、hsc70と比較して、熱変性タンパク質への結合および熱変性タンパク質の安定化に著しく効率的であるように見える。このことはこれらの構造的な違いを反映し、ストレスタンパク質がワクチンとして機能する能力の一要因であるペプチド結合特性に影響を及ぼす可能性がある。hsp70およびhsp110はワクチン効率がほぼ同じであるが、異なるサブセグメントのペプチドを結合するのかもしれない。すなわち、hsp110は、hsc70に容易に結合しない抗原工ビトープを運ぶ可能性がある。すなわち、hsp70およびhsp110は、異なる(質量)効率とはいかないまでも異なるワクチン能力を示す可能性がある。grp170について同様に論じることができる。これらのストレスタンパク質のモル効率における著しい差は、ペプチド結合親和性が異なること、それぞれのストレスタンパク質ファミリーに

結合されるペプチドの性質が異なること、またはこれら4種類の各ストレスタンパク質群と相互作用する抗原提示細胞の親和性が異なることに起因する可能性がある。この群において最も効率的なワクチンであるgrp170が群の唯一の糖タンパク質であることをもまた注目に値する。

【 0 1 5 1 】

実施例7:hsp110とhsp25およびhsp70との相互作用

本実施例は、大きな分子複合体に存在することが発見されたhsp110の天然の相互作用を証明する。イムノプロト分析および共免疫沈降研究により、この複合体の成分として他の2つの熱ショックタンパク質hsp70およびhsp25が同定された。精製されたhsp25、hsp70、およびhsp110はインビトロで調べられた場合、大きな複合体を自発的に形成し、互いと直接相互作用することが観察された。このインビトロ系にルシフエラーゼを添加すると、熱ショック後に、ルシフエラーゼはこのシャペロン複合体の中に移動することが観察された。2種類のhsp110欠失変異体を調べることにより、hsp110のペプチド結合ドメインがhsp25との相互作用に必要とされるが、hsp70との相互作用には必要とされないことが証明された。hsp110-hsp70-hsp25複合体の潜在的な機能について検討する。

【 0 1 5 2 】

材料および方法

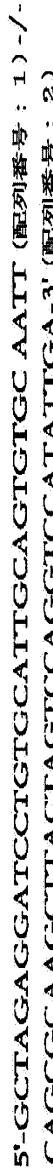
試薬

ウサギ抗hsp110抗体はリーヨーン(Lee-Yoon), Dら, 1995, J. Biol. Chem. 270, 15725-15733により特徴付けられている。アフティニティ精製されたマウス抗hsc70モノクローナル抗体、ウサギ抗マウスhsp25抗体、ラット抗hsp90抗体、およびラット抗TCP-1aモノクローナル抗体、ならびに組換えhsc70およびマウスhsp25は全てStressgen Biotechnological Corp(Victoria, Canada)から入手した。抗His抗体はAmershamから購入した。colon26腫瘍細胞は、5% CO₂ インキュベーター内で、10% ヴィンクリシンを添加したDMEM中で培養した。

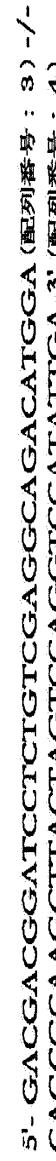
【 0 1 5 3 】

プラスミド構築および発現組換えの、Hisタグ融合された、hsp110およびここで用いた2種類の欠失変異体

の精製は、オ一、H. J. ら、1997, J. Biol. Chem. 272, 31636-31640およびオ一、H. J. ら、1997, J. Biol. Chem. 274: 15712-15718に記載されている。簡単に述べると、hsp110 が変異体の構造のために、プライマー



(変異体 #1、アミノ酸 375 ~ 858) を用ひ



(変異体 #2、アミノ酸 508 ~ 858) を用いてラセマ連鎖反応に用いた。PCR 産物を PCR ベクター (Invitrogen) にクローニングし、His₆-（エンテロキナーゼ認識配列）および追加の Asp-Arg-Trp-Gly-Ser (変異体 #1 用) または Asp-Arg-Trp (変異体 #2 用) を hsp110 変異体の N 末端に付加した。プラスミドで大腸菌 JM109 (DE3) 株を形質転換し、発現産物を Ni²⁺ トリクロリウム三酢酸-アガロースカラム (QIAGEN, Inc.) により精製した。Bio-Rad タンパク質アッセイキットを用いてタンパク質濃度を測定した。

【 0 1 5 4 】

天然 hsp110 の精製細胞をリソ酸緩衝食塩水で洗浄し、Teflon モジナイヤーを用いて、5 倍体積の緩衝液 (30 mM NaHCO₃, pH 7.5)、1 mM フェニルメチルペプチドヌクlease (PMSF) と共にホモジナイズした。ホモジネートを 12,000 × g で 20 分間遠心分離し、上清を、100,000 × g で 2 時間さらに遠心分離した。最初に、細胞抽出物を ConA-セファロースカラムにアブライし、非結合タンパク質を収集し、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、0.1 mM ジチオスレオトールで平衡化されたアイオノン交換カラム (Mono Q, Pharmacia) にかけた。結合タンパク質を直線塩勾配 (200 mM ~ 350 mM NaCl) で溶出した。ブールされた hsp110 画分をセントリコン 30 (centrificon) を用いて濃縮し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM DTT で平衡化された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用サイス排除カラム (スープラロース 6, Pharmacia) にアブライし、次いで、0.2 ml/分の流速で溶出した。タンパク質マークとして、チロゲ

ロブリニン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(158kDa)、アルブミン(67kDa)、およびオボアルブミン(43kDa)を用いた。

【 0 1 5 5 】

ウエスタンブロット分析

細胞をPBSで洗浄し、50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton X-100、およびブローテアーゼ阻害剤中で溶解した。氷上で30分間のインキュベーション後、細胞抽出物を、等量のSDS試料緩衝液(50mM Tris-HCl(pH6.8)、5% β -メルカプトエタノール、2% SDS、10% グリセロール)と共に10分間煮沸し、10,000gで20分間遠心分離した。等量のタンパク質試料を7.5~10% SDS-PAGEにかけ、イモビロン(Immobilion)-Pメッシュ(Millipore, Ltd., UK)に電気的に移した。メンブレンを、TBST(20mM Tris-HCl(pH7.4)、137mM NaCl、0.05% Tween-20)に溶解した5% 脱脂乳を用いて室温で1時間ブロッキングし、次いで、TBSTで1:1000に希釈された一次抗体と共に2時間インキュベートした。洗浄後、メンブレンを、TBSTで1:2000に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgGと共にインキュベートした。化学発光増幅(Enhanced Chemiluminescence)検出システム(Amersham, Arlington Heights, IL)を用いて、免疫反応性を検出した。

【 0 1 5 6 】

免疫沈降

細胞を冷PBSで3回洗浄し、緩衝液(10mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、2mM EDTA、0.5% デオキシリコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% NP40、10 μ g/mlロイペチチン、25 μ g/mlアブロチニン、1mM ABESF、0.025% NaN₃)中で溶解した。溶解産物を遠心分離し、上清を、ブロテイニアピーズ30mlと共に0.05倍体積の免疫前血清で1時間、前吸着(presorb)させた。溶解産物を、hsp110抗体(1:100)またはhsc70抗体(1:200)またはhsp25抗体(1:100)と共に4℃で一晩インキュベートした。シヤベロニンとの相互作用をインシビト口で分析するためには、組換え野生型hsp110およびhsp110変異体を、最初に、hsc70またはhsp25と共に30℃で4℃で一晩さらにインキュベートした。次いで、hsc70抗体またはhsp25抗体を添加し、4℃で2時間、沈降させた

沈降物を、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% SDS、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、1% NP40で3回洗浄し、SDS試料緩衝液30～40 μlを添加し、5分間煮沸した。上清を7.5～12% SDS-PAGEにかけ、イムノブロッティングにより分析した。

【 0 1 5 7 】

ルシフェラーゼとHSPとの相互作用

25 mM Hepes (pH 7.9)、5 mM 酢酸マグネシウム、50 mM KCl、5 mM b-メルカプトエタノール、および1 mM ATPに溶解したhsp110、hsc70、およびhsp25(各150 nM)と共に、ルシフェラーゼ(Boehringer Mannheim)を室温または43°Cで30分間インキュベートした。溶液を16,000gで20分間遠心分離し、20 mM Tris-HCl (pH 7.8)、150 mM NaCl、および2 mM DTTで平衡化されたセファクリル(Sephacryl) S-300カラム(Pharmacia)に上清を負荷した。タンパク質を、0.24 ml/分の流速で、4°Cで溶出した。画分を収集し、ウエスタンブロッティングにより分析した。

【 0 1 5 8 】

結果

hsp110はhsc70およびhsp25を含む大きな複合体として存在するhsp110の生理学的役割を調べるために、Colon26細胞における天然hsp110の特徴付けを行った。細胞抽出物を、ConA-セファロースカラムおよびMonoQカラムでの連続クロマトグラフィーにかけた後、部分的に精製されたhsp110画分をスープ一口ース6サイズ排除カラム(最大分解能5,000 kDa)にかけた。ConAおよびイオニア交換により精製されたhsp110画分は、スープ一口ースカラムから、200 kDa～700 kDaのサイズ範囲の画分に溶出することが観察された(図 9A)。セファクリル300(デキストランアリルノビスアクリルアルアミドマトリックス)カラムを用いて作業を繰返し、分析により同様のデータが得られた。

【 0 1 5 9 】

hsp110が高分子量の1本の広いピークとして溶出されたので、この大きなインサイチューハsp110複合体がまた、さらなる成分(潜在的に、他の分子シャペロンおよびノマタはhsp110と相互作用し得る細胞基質を含む)を含む可能性があることを理にかなっている。この可能性を調べるために、イオン交換カラムおよびサイ

ズ排除カラムから得られた精製hsp110画分を、入手可能な抗体を用いた他のHSPのイムノプロットティングにより調べた。図9Bに示すように、hsp90、hsc70、T-複合体ボリペプチド1(TCP-1)、およびhsp25に対する抗体を用いた。4種類全てのタンパク質を全細胞溶解産物で容易に検出することができた(レーン1、3、5、および7)。hsp110画分を調べた場合に、TCP-1およびhsp90は観察されなかつた(レーン2および6)。しかしながら、hsc70およびhsp25は両方ともhsp110と同時に精製されることが判明し、hsc70の全細胞画分はhsp25の全細胞画分より著しく多かつた。サイズ排除カラムかららのhsc70およびhsp25のクロマトグラフィープロファイルもまた、hsp110のものと同様のパターンを示した(図9A)。

【 0 1 6 0 】

この同時精製もまたこれら3種類の分子シャペロン間の相互作用を反映したのか、確かめるために、Colon26細胞抽出物およびhsp110画分を用いて、相互的な共免疫沈降分析を行った。hsc70およびhsp25は、抗hsp110抗体を用いてhsp110と共に沈降することが示された(図10A)。逆に、hsp110は、抗hsc70抗体または抗hsp25抗体で共沈された(図10Bおよび図10C、上部)。対応する負の結果を伴う陰性对照として免疫沈降を行ったために、免疫前血清も用いた。最後に、hsc70とhsp25との相互作用を、hsc70抗体およびhsp25抗体を用いて分析した。もう一度、これら2種類のタンパク質は互いと共免疫沈降するこことが観察された(図10Bおよび図10C、下部)。前記の研究から、hsp110、hsc70、およびhsp25はインササイチュード直接的または間接的に相互作用すると結論づけることができる。

【 0 1 6 1 】

イシビト口でのhsp110とhsc70およびhsp25との相互作用の分析hsp110、hsc70、およびhsp25がイニビト口で相互作用するか、ならびに精製タンパク質成分を用いることにより高分子量複合体を形成することができることを確かめるために、この混合物にルシフエラーゼを潜在的な基質として添加した。hsp110は、熱変性後に、このレポータータンパク質を可溶化できることが示されている。ルシフエラーゼを、hsp110、hsc70、およびhsp25混合物と共に(1:1のモル比で)室温または43℃で30分間インキュベートした。可溶性画分をセファクリルS-300カラムにかけ、溶出された画分をSDS-PAGE上で移動させ、hsp110、hsc70、h

s p 2 5 、 お よ び ル シ フ エ ラ ー ゼ に 対 す る 抗 体 を 用 い た イ ム ノ プ ロ ッ テ ィ ン グ に よ り 分 析 し た。

【 0 1 6 2 】

こ の 研 究 の 結 果 を 図 11A お よ び 図 11B に 示 す。再 度 、 h s p 1 1 0 、 h s c 7 0 、 お よ び h s p 2 5 は 高 分 子 量 画 分 に 存 在 す る こ と が 判 明 し た。しか し な が ら 、 こ れ ら の 画 分 は 、 イ ン ビ ボ で 見 ら れ る も の (図 11A) よ り 著 し く 大 き な 分 子 サ イ ズ で 溶 出 さ れ た。さ ら に 、 热 处 理 は 、 h s p 1 1 0 、 h s c 7 0 、 お よ び h s p 2 5 の 溶 出 パ タ ー ソ を 变 え な い こ と が 分 か つ た。しか し な が ら 、 加 热 前 に h s p 1 1 0 複 合 体 と 同 時 に 溶 出 し な か つ た (单 量 体 と し て 存 在 す る) ル シ フ エ ラ ー ゼ は 、 热 暴 露 後 に 高 分 子 量 構 造 に 移 動 す る こ と が 観 察 さ れ た (図 11B)。こ れ ら の 実 験 に お い て 、 ル シ フ エ ラ ー ゼ の ほ ど ん ど 全 て が 可 溶 性 形 態 で 維 持 さ れ た。ル シ フ エ ラ ー ゼ は 单 独 で 加 热 さ れ た 場 合 、 急 速 に 不 溶 性 に な つ た。热 シ ョ ッ ク は 、 3 種 類 の h s p 1 1 0 、 h s c 7 0 、 ま た は h s p 2 5 の 可 溶 性 に 不 溶 性 に な つ た。熱 シ ョ ッ ク は 、 3 種 類 の h s p 1 1 0 、 h s c 7 0 、 ま た は h s p 2 5 の 可 溶 性 に 不 溶 性 に な つ た。

【 0 1 6 3 】

前 記 の デ ー タ に よ り 、 h s p 1 1 0 、 h s c 7 0 、 お よ び h s p 2 5 は イ ン ビ ポ ト 口 で 高 分 子 量 構 造 で 同 時 精 製 さ れ 、 同 様 に 、 ル シ フ エ ラ ー ゼ も 存 在 す れば 加 热 後 に 同 時 精 製 さ れ る こ と が 分 か る。こ の こ と は 、 こ れ ら の タ イ ナ パ ク 質 が ど の よ う に そ れ ら 自 身 と 相 互 作 用 す る の か 、 ま た は こ れ ら の い ず れ か 2 つ が 相 互 作 用 す る こ と を 全 く 示 し て い な い。しか し な が ら 、 加 热 さ れ た ル シ フ エ ラ ー ゼ が 可 溶 性 の ま ま で あ る こ と は 、 こ れ ら の シ ャ ベ ロ ン の 少 な く と も 1 つ と 相 互 作 用 し た 証 挑 で あ る。こ れ ら の シ ャ ベ ロ ン が ど の よ う に 相 互 作 用 す る か を 確 か め る た め に 、 共 免 疫 沈 降 実 験 を 、 精 製 タ イ ナ パ ク 質 の 対 を 用 い て 再 度 行 つ た。h s c 7 0 お よ び h s p 1 1 0 は h s p 2 5 の 非 存 在 下 で 相 互 作 用 す る こ と が 判 明 し (図 12 、 レ ー ソ ン 1) 、 そ れ に 対 応 し て 、 h s p 1 1 0 は 、 h s c 7 0 の 非 存 在 下 で h s p 2 5 单 独 と 共 に 沈 降 す る こ と が 観 察 さ れ た (レ ー ソ ン 4)。最 後 に 、 h s c 7 0 お よ び h s p 2 5 は ま た h s p 1 1 0 の 非 存 在 下 で 共 沈 す る (レ ー ソ ン 8)。

【 0 1 6 4 】

最 後 に 、 h s p 1 1 0 シ ャ ベ ロ ン の 最 も 单 純 化 し た 形 態 (す な わ ち 、 機 能 形 態 お よ び 非 機 能 形 態) で あ る こ と が 以 前 に 示 さ れ て い る 2 種 類 の h s p 1 1 0 久 失 変 异 体 (オ ー , H . J. ら , 1999, J. Biol. Chem. 274:15712-15718) を 調 べ る こ と に よ り 、 h s p 1 1 0 、 h s c 7 0

、およびhsp25間の相互作用を明らかにするこのインビトロ研究を展開した。調べられた第1の変異体(#1)は、hsp110のN末端ATP結合ドメインを欠いているが、残りの配列(すなわち、隣接する β シートペプチド結合ドメインおよび他のC末端配列)を含む(サイズ:75 kDaおよびアミノ酸375~858を含む)。この変異体は、オールディング可能な状態に熱変性ルシフェラーゼを安定化する能力において十分に機能的であることが示されている。ここで用いられた第2の変異体(#2)は、ATP結合ドメインならびに隣接する β シート(ペプチド結合)ドメインを欠いているが、残りのC末端配列を含んでいた(サイズ:62 kDaおよびアミノ酸508~858を含む)。最近、この変異体は、熱変性ルシフェラーゼを可溶性状態に維持するシヤベロシン機能を遂行できないことが示されている。

卷之三

変異体 #1 (ATP結合ドメイシンなし)は、hsp70(レーン2)およびhsp25(レーン5)の両方と共に沈殿することが観察された。このことから、これらはATP結合ドメイシンを必要としないことが分かる。しかししながら、変異体 #2 (hsp110のATP結合領域およびペプチド結合領域の両方を欠く)はhsp70とだけ会合する事が観察された(レーン3)。このことから、hsp25およびhsp70は異なる部位でhsp110と相互作用することができ、hsp110とhsp25との会合にはhsp110のペプチド結合ドメイシンが必要であることが分かる。

10166

卷六

本実施例は、Colon26細胞におけるhsp110の天然の相互作用の研究について述べる。この結果から、hsp110はhsc70およびhsp25と同時に精製されることが分かる。其免疫沈降の結果はこれら3種類のシャペロン間の直接的な相互作用を反映している可能性があることを確かめるために、また、これらの相互作用を明確にするために、精製されたhsp110、hsc70、およびhsp25を用いてインビトロ研究を行った。これら3種類のシャペロンはまたインビトロで大きな分子複合体を自発的に形成するが、熱ストレスによらずに、この複合体は添加基質の非存在下で形成するようになるに誘導することができる。

[0 1 6 7]

これららのタンパク質の各対(すなわち、hsc70とhsp110、hsc70とhsp25、およびhsp110とhsp25)は直接的に相互作用できることも分かった。このことと、細胞溶解産物から得られた共沈デークから、これららの相互作用はインサイチューで自然に起ることが強く示される。さらに、2種類のhsp110欠失変異体を用いることにより、hsp110のペプチド結合ドメインはhsp25結合に必要とされるが、hsc70結合には必要とされず、hsp110のATP結合ドメインは、hsc70との相互作用にもhsp25との相互作用にも必要とされないことが証明された。このことから、hsp110はそのペプチド結合ドメインを介してhsp25に結合することが示唆される。hsc70-hsp110結合がhsp110ペプチド結合ドメインを介してhsp110に能動的に結合する(すなわちhsc70の)ペプチド結合ドメインを介してhsp110に能動的に結合している可能性があることが示唆されるが、この2つのタンパク質が他のC末端ドメインの関与によつて相互作用する可能性はなくならない。

[0 1 6 8]

これららのhsp110とhsc70との相互作用は、これららのタンパク質が協同的に機能することができる方法に関する可能性を提起する。hsc70およびhsp110のペプチド結合ドメインは、シャベロン機能の遂行における、「実働部隊(business end)」に相当すると思われるので、これららのペプチド結合ドメイソンは基質と能動的に会合するが、互いに会合しないことが予想される。このことは、この複合体が細胞の要求を待ち受けるシャベロン「収納区画(storage compartment)」に相当するという可能性を提起する。しかしながら、この複合体それに能動的なシャベロン活性があることを示している。基質をhsp110からhsc70に移動させて、その後にDnajホモログおよび他のシャベロンと連携してフォールディングを行いうる、hsc70はhsp110を上にのせていける可能性がある。

[0 1 6 9]

hsp110は、hsc70と同様に(オ一, H. J. ら, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 31636-31640; オ一, H. J. ら, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 15712-15718)、Dnajコシャベロン(co-chaperone)

ron)と連携したフォールディング機能を有することがまだ示されてない。しかしながら、hsp110はhsp70とは異なるATP結合特性を示し、hsp110の可能性のあるコショウペロンが発見される可能性がある。以前のイニビト研究から、sHSP(例えば、hsp25)は非天然タンパク質を結合するが、リフォールディングにはhsp70の存在が依然として必要とされることが証明されている(リー(LEE), G. J. ら, 1997; EMBO J. 16, 659-671; ヤコブ(Jakob), U. ら, 1993, J. Biol. Chem. 268, 7414-7421; メルク(Merck), K. B. ら, 1993, J. Biol. Chem. 268, 1046-1052; カンゼンガ(Kamringa), H. H. ら, 1994, Biophys. Res. Commun. 204, 170-1177; エルンスバーガー(Ernst Sperger), M. ら, 1997, EMBO J. 16, 221-229)。hsp110およびsHSPは、シャベロン機構を含むhsp70-DnaJへの後の往復(shuttling)のために、広範囲の様々な基質の特異的な結合に作用する可能性がある。

【 0 1 7 0 】

これら3種類のシャベロンが相互作用することは一般的な現象を示している可能性がある。最近、プレソフスキ・ビグ(Plesofsky-Vig)およびブランブル(Bramble)は、アカバシカビ(Neurospora crassa)の小HSP(hsp30と呼ばれる)が2種類の細胞タンパク質hsp70およびhsp88に結合することを示した。hsp88のクローニングおよび分析から、hsp88はアカバシカビのhsp110に相当することが分かった(プレソフスキ・ビグ, N. よびブランブル, R., 1998, J. Biol. Chem. 273, 11335-11341)。このことから、ここで述べた相互作用は系統学的に保存されていることが示唆される。さらに、ハタヤマ(Hatayama)は、FM3A細胞における(ハタヤマ, T. ら, 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 248, 394-401)。本実施例で観察されたhsp110複合体のサイズおよびhsc70との相互作用(これもさらなるイオン交換クロマトグラフィー段階を用いた)は、この最近の報告と明らかに似ており、非常によく一致している。最後に、ステロイドホルモン受容体におけるhsc70および他のタンパク質との会合が以前に確認されたにもかからず、本研究ではhsp90およびTCP-1はhsp110複合体において観察されなかつた。しかししながら、最近、hsp110ファミリーの酵母の構成要素をコードするSSE1は糖質コルチコイド受容体の機能に必要とされ、hsp90と物理的に会合していることが示された(リウ(Liu), X. D. ら, 1999, J. Biol. Chem.

274, 26654-26660)。

【 O 1 7 1 】

本実施例で示したデータから、この複合体は、より多種多様な基質タンパク質をフォールティング可能な状態に保つ、およびノマタはより効率的に基質タンパク質をフオールティング可能な状態に保つ、改善した能力をもたらすことをが示唆される。この結果から、さらなるシャベロンの存在下で変性タンパク質をリボオールティングするためには獲得された改善した能力があり得ることがさらにも示唆される。

【 O 1 7 2 】

実施例8:ストレスボリペプチド複合体のインビトロ形成および安定性

本実施例は、ストレスボリペプチドと免疫原性ボリペプチドの複合体がインビトロで生成でき、このような複合体が凍結融解後に安定なままであることを証明する。さらに、hsp110およびgrp170は両方とも、異なるペプチド(癌および感染症と関連する抗原を含む)と複合体を形成することができます。

【 O 1 7 3 】

図13は、インビトロで結合複合体を形成した後の、抗hsp110抗体および抗grp170抗体を用いたher-2/neu細胞内ドメイシン(ICD)免疫沈降の結果を示す。レーン1は205kDa～7.4kDaのタンパク質標準である。レーン2はhsp110+抗hsp110抗体である。レーン3はhsp110+ICDである。レーン4はgrp170+ICD(結合緩衝液に溶解)である。レーン5はgrp170+ICD(PBSに溶解)である。レーン6はICDである。レーン7はhsp110である。

【 O 1 7 4 】

図14は、抗hsp110抗体を用いた複合体免疫沈降後の、新鮮な試料(左レーン)および凍結融解試料(中央レーン)におけるhsp110-ICD複合体を示すウエスタンブロットである。右レーンはICDである、これらの結果から、hsp110-ICD複合体は凍結融解後に安定であることが分かる。

【 O 1 7 5 】

図15は、改良ELISAおよびp546(HLA-A2結合親和性およびhsp110に対する予想される結合のために選択された、her-2/neu膜貫通ドメインの1omerペプチド

(VLTQGLPNEYV ; 配列番号 : 6)

を用いた、hsp-ペプチド結合を示す棒グラフである。このペプチドをビオチン化し、イシビト口でhsp110と混合した(PBS 150μl中、ペプチド 60μgおよびhsp110 60μg)。混合物を43℃で30分間、次いで、37℃で1時間インキュベートした。混合物を、セントリコン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去した。BSA(1%)もまたビオチン化ペプチド100μgと共に同じ条件下インキュベートし、精製した。ウエルを、コーティング緩衝液に溶解した異なる濃度の精製混合物、ビオチン化ペプチド(陽性対照)、またはBSA(陰性対照)でコーティングした。4℃で一晩のインキュベーション後、ウエルをPBS-Tween20(0.05%)で3回洗浄し、PBSに溶解した1%BSAを用いて室温で1時間ブロッキングした。洗浄後、1:10000ストレブトアビジョン-HRPをウエルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。TMB基質を添加することにより発色させ、450nmでの吸光度を読み取った。精製混合物の濃度は、1μg/ml(白い棒)、10μg/ml(斜交平行線の棒)、および100μg/ml(濃い点描の棒)であった。

【O 176】

図16は、新鮮な試料および凍結融解されていて、イシビト口で結合複合体を形成した後の、抗hsp110抗体を用いたヒト型結核菌抗原Mt b8.4およびMt b39免疫沈降の結果を示す。レーン1は205kDa～7.4kDaのタンパク質標準である。レーン2はhsp110+Mt b8.4である。レーン3はhsp110+Mt b8.4(凍結融解後)である。レーン4はMt b8.4である。レーン5はhsp110である。レーン6はhsp110+Mt b39である。レーン7はhsp110+Mt b39(凍結融解後)である。レーン8はMt b39である。レーン9は抗hsp110抗体である。

【O 177】

実施例9:ストレスボリペプチド複合体は細胞性免疫反応を誘発する

本実施例は、her-2/neuに由来するペプチド(her-2/neuの細胞内ドメイン(ICC; アミノ酸残基676～1255)、細胞外ドメイン

(ECD; p369; KIFGSLAFL ; 配列番号 : 6)

、または膜貫通領域(p54.6)を含む)と複合体化されたhsp110が、刺激されたCTLにより測定されるよう免疫原性であることを証明する。このデータから、ICDと複合体化されたhsp110は、her-2/neuの他のペプチドと複合体化されたhsp110より強いCTL反応を生じることが分かる。

【 0 1 7 8 】

図17は、組換えマウスhsp110-ICD複合体25 μ gを用いた腹腔内免疫後のA2/Kb-LTアッセイ法でのスコア(1群当たり5匹の動物)のT細胞にによるIFN- γ 産生(ELISPOT)のマウスは、HLA-A2提示が可能であり、ながらビオチンでアラビノ糖鎖を保持し、さらなる細胞表面タンパク質相互作用をもたらすように、ハイブリッドヒトマウスクラース1分子の遺伝子が導入されている。2週間後に動物を追加免疫し、その2週間に屠殺した。対照群は25 μ gのICDもしくはhsp110を注射されたが、または免疫化されなかつた。抗CD8抗体でコーティングしたダイナナビーズ(Dynabeads)および磁気分離を用いてCD8 T細胞または枯渇した総脾細胞または骨髄細胞(5×10^6 細胞/ml)を25 μ g/ml PHA(チエックの棒)または20 μ g/ml ICD(濃い点描の棒)と共にインビトロで一晩培養し、ELISPOTアッセイ法を用いてIFN- γ 分泌を検出した。

【 0 1 7 9 】

図18は、イニシビトロで再構成されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性(IFN- γ 分泌用ELISPOTアッセイ法での陽性スコア)を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100 μ g)を、HLA-A2結合剤である9mer her-2/neuペプチド p369(100 μ g)と共に43℃で30分間インキュベートし、その後、室温で60分間インキュベートした。この複合体を、セントリコーン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去了した。8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウス(n=4)を、PBS 200 μ lに溶解した60 μ gのhsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)またはペプチドのみ(群B、濃い点描の棒)で腹腔内免疫し、2週間に後に追加免疫した。最後の注射の2週間に後に、動物を屠殺した。PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110を15U/mlのヒト組換えIL-2と共に添加した時に、動物の脾細胞(10^7 細胞/ml)が、PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110

によりインビトロで刺激された。非刺激細胞（陰性対照）のカウントは<40であり、刺激細胞のカウントから引かれた。

【O 1 8 0】

図19は、インビトロで再構成されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性(IFN- γ 分泌用ELISPOTアッセイ法での陽性スポットの数により測定される)を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100μg)を、HLA-A2結合剤である10mer her-2/neuペプチドp546(100μg)と共に43℃で30分間キュベートし、その後、室温で60分間インキュベートした。この複合体を、セシントリコーン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去した。8週齢のHLA-A2トランジエニックマウス(n=2)を、PBS 200μlに溶解した60μgのhsp110+ペプチド複合体（群A, 斜交平行線の棒）またはペプチドのみ（群B, 濃い点描の棒）で腹腔内免疫し、2週間後に追加免疫した。最後の注射の2週間後に動物を屠殺した。PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110を150U/mlのヒト組換えIL-2と共に添加した時に、動物の脾細胞(10⁷細胞/ml)が、PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110によりインビトロで刺激された。非刺激細胞（陰性対照）のカウントは<40であり、刺激細胞のカウントから引かれた。

【O 1 8 1】

実施例10:ストレスボリペプチド複合体は特異的抗体反応を誘発する

本実施例は、A2/Kbトランジエニックマウスにおけるhsp110-her-2/neu ICD複合体による免疫化が抗体反応を誘発することを証明する。この反応は特異的であり、her-2/neu ICDのみの投与により起くる反応より著しく大きい。従って、本発明のストレスボリペプチド複合体は、細胞性免疫および体液性免疫の両方を刺激することができます。

【O 1 8 2】

図20は、hsp110-ICD(her-2/neu)複合体で腹腔内免疫した後の、A2/Kbトランジエニックマウスにおける特異的な抗hsp110抗体反応を示すグラフである。血清および抗体の希釈の関数として、ELISA結果を450nmでの光学密度(OD)としてプロットした。抗hsp110の陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、ならびに0日目(黒丸)、14日目(白四角、点線)、および28日目(白四角、実線)の血清に

についての結果を示す。これらの結果から、マウスは hsp110 に対する自己免疫反応を起さなかったことが確認される。

【 O 1 8 3 】

図 21 は、hsp110-ICD複合体で腹腔内免疫した後の、A2/Kbトランクスジエニックマウスにおける特異的な抗 ICD 抗体反応を示すグラフである。血清および抗体の希釈の閾値として、ELISA 結果を 450 nm の光学密度 (OD) としてプロットした。抗 ICD の陽性対照（黒四角）、非関連抗体の陰性対照（白菱形）、ならびに 0 日目（黒丸）、14 日目（白四角、点線）、および 28 日目（白四角、実線）の血清についての結果を示す。これらの結果から、マウスは、ストレスタンパク質複合体による免疫化の後に、her-2/neu の ICD に対する特異的な抗体反応を起こしたことが確認される。

【 O 1 8 4 】

図 22 は、異なるワクチン処方で初回刺激した 2 週間後の、A2/Kbトランクスジエニック動物における特異的な抗 ICD 抗体反応を比較した棒グラフである。結果を、血清および抗体の様々な希釈に対する 450 nm の OD としてプロットした。棒は、hsp110-ICD（点描の棒）、完全フロイントアジュバントに溶解した ICD の陽性対照（CFA；チエックの棒）、ICDのみ（斜交平行線の棒）で初回刺激された動物、抗 ICD 抗体（濃い点描の棒）、および非関連抗体の陰性対照（白い棒）のデータを示す。

【 O 1 8 5 】

図 23 は、hsp110-ICD複合体を用いて A2/Kbトランクスジエニックを皮下初回刺激または腹腔内初回刺激した 2 週間後の、特異的な抗 ICD 抗体の生成を比較した棒グラフである。結果を、血清および抗体の様々な希釈に対する 450 nm の OD としてプロットした。棒は、0 日目での血清（点描の棒）、14 日目での血清（皮下）（斜交平行線の棒）、抗 ICD 抗体（濃い点描の棒）、および非関連抗体の陰性対照（白い棒）を示す。

【 O 1 8 6 】

実施例 11：Hsp110 ベクターでトランクスフエクトされた腫瘍細胞は Hsp110 を過剰発現する

本実施例は、hsp110 をコードするベクターでトランクスフエクトされた colon 26 細胞 (CT26) (CT26-hsp110 細胞) を特徴付けたデータを示す。これら CT26-hsp110

細胞は、イムノプロットでおよび免疫蛍光染色により証明されるようには $hsp110$ を過剰発現する。

【 0 1 8 7 】

図 24A は、CT26-hsp110 細胞の $hsp110$ 発現が、トランスフェクトされていない CT26 細胞および空のベクターでトランスフェクトされた CT26 細胞 (CT26-ベクター) と比較して増加していることを示すイムノブロットである。CT26 (レーン 1)、CT26-ベクター (レーン 2)、および CT26-hsp110 (レーン 3) からの等量のタンパク質試料を 10% SDS PAGE にかけ、イモビロジンプレンに移した。メンブレンを hsp110 抗体でブローピングした。洗浄後、メンブレンを、TBST $\times 1:2,000$ に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗 IgG またはヤギ抗マウス IgG と共にインキュベートした。化学発光增幅検出システムを用いて、免疫反応性を検出した。

【 0 1 8 8 】

図 24B は、CT26-hsp110 細胞の hsc70 発現が、トランスフェクトされていない CT26 細胞または空のベクターでトランスフェクトされた CT26 細胞と比較して増加していないことを示す。メンブレンを hsc/hsp70 抗体でブローピングした以外は図 24 と同様に、CT26 (レーン 1)、CT26-ベクター (レーン 2)、および CT26-hsp110 (レーン 3) からの等量のタンパク質試料を調製した。

【 0 1 8 9 】

図 25A は、CT26 細胞における $hsp110$ の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写真である。染色の前日に細胞をカバーラスに播種した。次いで、カバーラスをウサギ抗 $hsp110$ 抗体 ($1:500$ 希釈) と共にインキュベートし、その後、FITC 標識イヌ抗ウサギ IgG 染色を行った。正常ウサギ IgG を陰性対照として用いた。

【 0 1 9 0 】

図 25B は、空のベクターでトランスフェクトされた CT26 細胞における $hsp110$ の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写真である。図 25A と同様に細胞を調製し、免疫染色した。

【 0 1 9 1 】

図 25C は、 $hsp110$ 過剰発現細胞における $hsp110$ の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写

真である。図25Aと同様に細胞を調製し免疫染色した。

【O 1 9 2】

実施例12:Hsp110を過剰発現する腫瘍細胞の増殖特性

本実施例は、CT26-Hsp110細胞のイシビがおよびイシビトロ増殖特性を特徴付けるデータを示す。

【O 1 9 3】

図26は、播種1～5日後の細胞数としてプロットされた、野生型およびHsp110トランスクレクト細胞株のイシビトロ増殖特性を示すグラフである。細胞を、 2×10^4 細胞/ウエルの密度で播種した。24時間後に、細胞をカウントした(0日目と指定した)。示された日に、3個のウエルから細胞をカウントした。結果は、野生型CT26細胞(丸)、空のベクターでトランスクレクトされたCT26細胞(四角)、およびHsp110トランスクレクトCT26細胞(三角)を用いた3つの独立した実験の平均±SDである。

【O 1 9 4】

図27は、軟寒天におけるコロニー形成能力に及ぼすHsp110過剰発現の影響を示す棒グラフである。野生型CT26細胞、空のベクターでトランスクレクトされたCT26ベクター細胞、およびHsp110過剰発現CT26-Hsp110細胞を0.3%寒天にプレーティングし、軟寒天においてコロニーを形成する能力(≥ 0.2)について分析した。CT26ベクターと比較して $P < 0.05$ であつた(ステュードントt検定により評価した)。

【O 1 9 5】

図28は、野生型およびHsp110トランスクレクトCT26細胞株のイシビボ増殖特性を示すグラフである。 5×10^4 個の細胞をball/cマウスの側腹部に皮下接種した。キヤリバスで縦径および横径を測定して、腫瘍増殖を毎週2回記録した。CT26野生型細胞(丸)、空のベクターでトランスクレクトされたCT26細胞(四角)、Hsp110でトランスクレクトされたCT26細胞(5×10^4 個)(上向き三角)、およびHsp110トランスクレクトされたCT26細胞(5×10^5 個)(下向き三角)についての腫瘍体積(mm^3)を腫瘍移植後の日数の閏数としてプロットした。

【O 1 9 6】

実施例 13 : CT26-Hsp110 細胞による免疫化は腫瘍抗原投与から保護する

本実施例は、放射線照射された hsp110 過剰発現 CT26 細胞で免疫化されたマウスが、CT26 生細胞による後の抗原投与から保護されることを証明する。さらに、CT26-hsp110 細胞による免疫化は、腫瘍特異的な CTL 反応および抗体反応を誘発する。

【 0197 】

図 29 は、CT26 生細胞による抗原投与に対する反応に及ぼす、放射線照射された hsp110 過剰発現 CT26-hsp110 細胞で免疫化されたマウス、CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2 週間後、マウスの右側腹部に CT26 生細胞を用いて抗原投与した。予備免疫(premunination)なしのマウスにおける腫瘍増殖も示した。結果を、腫瘍抗原投与後の日数の関数として、PBS で免疫化され、 5×10^6 個の CT26 細胞で抗原投与されたマウス(丸)；放射線照射された、空のベクターを有する CT26 細胞で免疫化され、 5×10^6 個の CT26 細胞で抗原投与されたマウス(上向き三角)；放射線照射された CT26-hsp110 細胞で免疫化され、 5×10^6 個の CT26 細胞で抗原投与されたマウス(下向き三角)；および放射線照射された CT26-hsp110 細胞で免疫化され、 5×10^6 個の CT26 細胞で抗原投与されたマウス(菱形)についての腫瘍の無いマウスのバーセントとしてプロットした。

【 0198 】

図 30 は、腫瘍由来 hsp110 による免疫化により誘発された腫瘍特異的な CTL 反応を示すグラフである。マウスに、 5×10^6 個の放射線照射された(9,000rad) CT26-空のベクターおよび CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2 週間後、脾細胞をエフエクター細胞として単離し、放射線照射された Colon26 を用いてインビトロで 5 日間再刺激した。標的細胞として、Cr 標識 Colon26 を用いて、リノバ球の細胞傷害活性を分析した。この実験において MethA 腫瘍細胞も標的として用い、細胞溶解は観察された。結果を、エフェクター：標的比の関数として、対照(丸)、放射線照射された CT26 細胞(四角)、および放射線照射された CT26-hsp110 細胞(三角)についての特異的溶解率(%)としてプロットした。

【 O 1 9 9 】

図 31 は、放射線照射された hsp110 過剰発現細胞で免疫化した後の、CT26 細胞に対する抗体反応を示すグラフである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射された (9,000 rad) CT26-空のベクターおよび CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2週間後、血清を収集し、ELISA を用いて抗体反応についてアッセイした。結果を、血清希釈の関数として、対照(丸)、CT26-空のベクター(四角)、およそ CT26-hsp110 (三角)についての 450 nm の OD としてプロットした。

【 O 2 0 0 】

実施例 14: GM-CSF 分泌細胞は CT26-Hsp110 細胞の保護効果を高める

本実施例は、GM-CSF 遺伝子でトランシスフエクトされた細胞が CT26-hsp110 細胞と同時に注射された場合、この併用療法で処置された全てのマウスを腫瘍の無いままにする、腫瘍抗原投与に対する保護の強化をもたらすことを証明する。

【 O 2 0 1 】

図 32 は、hsp110 過剰発現細胞の増殖に及ぼす、バイスタンダー (bystander) 細胞から GM-CSF の影響を示すグラフである。マウスに、以下のとおり 5×10^4 個の腫瘍細胞を皮下注射した： CT26-空のベクター細胞(丸)、CT26-ベクター一細胞 + 放射線照射された B78H1GM-CSF 細胞(2:1 の比)、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射された B78H1GM-CSF 細胞(2:1 の比；上向き三角)、CT26-hsp110 細胞(下向き三角)、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射された B78H1 細胞(2:1 の比；菱形)。B78H1GM-CSF は、CM-CSF 遺伝子でトランシスフエクトされた B16 細胞であるのにに対して、B78H1 は野生型細胞である。腫瘍増殖を、腫瘍増殖の大きさを測定することにより記録し、移植後の日数の関数として腫瘍体積 (mm^3) としてプロットした。

【 O 2 0 2 】

図 33 は、野生型 CT26 腫瘍細胞抗原投与に対する反応に及ぼす、放射線照射された hsp110 過剰発現腫瘍ワクチンおよそ GM-CSF 分泌バイスタンダー細胞を同時に注射した影響を示すグラフである。マウスを、以下のとおり、放射線照射された 5×10^5 個の腫瘍細胞で皮下免疫した： CT26-空のベクター細胞、CT26-ベクター一細胞 + B78H1GM-CSF 細胞(2:1 の比；四角)、CT26-hsp110 細胞 + B78H1GM-CSF 細胞(2:1；上向き三角)、CT26-hsp110 細胞(下向き三角)、CT26-hsp110 細胞 + B78H1 細胞(2:1；菱

形)。PBS(丸)でのみ免疫化されたマウスの結果も示す。マウスを別の部位に CT₂₆野生型細胞で抗原投与し、1日おきに腫瘍発生についてモニターした。結果を、腫瘍抗原投与後の示された日数での、腫瘍の無いマウスのバーセントとしてプロットした。

【 0 2 0 3 】

実施例 15：腫瘍由来ストレスタンパク質複合体による免疫化は細胞性免疫を刺激し、転移性腫瘍増殖を阻害する

本実施例は、本発明の腫瘍由来ストレスタンパク質複合体を用いて、細胞性免疫を刺激し、転移性腫瘍増殖を阻害することができることを証明する。インターフェローザンの分泌が、colon 26腫瘍由来 hsp110 や grp170 などに B16F10 由来 grp170 を用いた免疫化により刺激された。B16F10 由来 grp170 による免疫化はまた、腫瘍特異的 CTL 反応および肺転移の減少を誘発することが示された。

【 0 2 0 4 】

図 34 は、colon 26 由来 hsp110 または grp170 による免疫化がインターフェローザン(IFN- γ) の分泌を刺激することを示す棒グラフである。マウスを hsp110 または grp170 で免疫化した 1 週間後に、ELISPOT アッセイ法のために脾細胞を単離した。フィトヘマグロビン(PHA) 处理りンパ球を陽性対照のために用いた。

【 0 2 0 5 】

図 35 は、B16F10 肿瘍由来 grp170 を用いた免疫化により誘発された腫瘍特異的 CTL 反応を示すグラフである。マウスを grp170 (40 μ g) で 1 週間おきに 2 回免疫化した。第 2 の免疫化の 1 週間後、脾細胞をエフェクター細胞として単離し、放射線照射された B16F10 細胞を用いて 5 日間インビトロで再刺激した。⁵ Cr 標識された B16F10 細胞または MethA 細胞を標的細胞として用いて、脾細胞の細胞傷害活性を分析した。結果を、エフェクター : 標的比の関数として、对照(丸)、肝臓由来 grp170 (四角)、B16F10 由来 grp170 (上向き三角)、および Methyl A 由来 grp170 (下向き三角)についての特異的溶解率(%)としてプロットした。

【 0 2 0 6 】

図 36 は、B16F10 由来 grp170 による免疫化が IFN- γ 分泌を刺激することを示す。マウスを hsp110 または grp170 で免疫化した 1 週間後に、ELISPOT アッセイ法のため

に脾細胞を単離した。

【0207】

図37はマウスの肺転移を示し、ここで、 1×10^6 個のB16F10細胞を、それぞれのC57BL/6マウスの尾静脈に静脈内接種した。腫瘍細胞を注射した24時間後に、マウスをPBS(黒丸)、肝臓由来group170(白丸)、または腫瘍由来group170($40\mu\text{g}$)で処置した。3種類の処置を全実験計画の間に行つた。腫瘍注射の3週間後に動物を屠殺し、肺を取り出し、表面コロニーをカウントした。

【0208】

前記から、本発明の特定の態様が例示のために本明細書で説明されたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更がされ得ることが理解されると思われる。従つて、本発明は、添付の特許請求の範囲によつて制限される場合を除いて制限されることはない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Corixa Corporation et al.

<120> STRESS PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS
FOR PREVENTION AND TREATMENT OF CANCER AND INFECTIOUS
DISEASE

<130> 126.11WOU3
<150> 60/156,821
<151> 1999-09-30
<150> 60/163,168
<151> 1999-11-02
<150> 60/215,497
<151> 2000-06-30
<160> 6
<170> FastSEQ for windows Version 4.0
<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Primer
<223> Primer
<400> 2
gttagggat ctttgttatt gcaatgttca att
33
<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Primer
<400> 2
cagcccaago ttactatcc agtccatat tga
33
<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Primer
<223> Primer

```

<400> 3
gacgacggat catttttoga gggagacatg ga
32

<210> 4
<211> 3.3
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
caggccaaatc ttactatgtcc aggttcataat tca
33

<210> 5
<211> 1.0
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
1                               5
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1                               5


```

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】精製された hsp70 のゲル染色は、各々、レーン 1 及び 2 に示す。腫瘍由来の hsp110 及び hsp70 のゲル染色は、各々、レーン 3 及び 4 は、各々、hsp110 抗体及び hsp70 抗体によるイムノブロット分析の結果を示す。

【図 1 B】精製された grp78 のゲル染色はレーン 1 に、肝由来の grp170 のゲル染色はレーン 2 に、腫瘍由来の grp78 のゲル染色はレーン 3 に、肝由来の grp78 のゲル染色はレーン 4 に示す。grp170 抗体及び grp78 抗体によるイムノブロット分析の結果は、各々、レーン 5 ～ 6 及び 7 ～ 8 に示す。

【図 2 A】精製した hsp110 による免疫化後の腫瘍増殖を示す。腫瘍容積 (mm³) は、PBS(丸)、肝由来の hsp110 40 μg(四角)、腫瘍由来の hsp110 20 μg(上向き三角)、腫瘍由来の hsp110 40 μg(下向き三角)、及び腫瘍由来の grp110 60 μg(菱形)で免疫化されたマウスについて、20,000 個の colon 26 腫瘍細胞で抗原投与後の日数に対してプロットした。

【図 2 B】精製した grp170 による免疫化後の腫瘍増殖を示す。腫瘍容積 (mm³) は、PBS(丸)、肝由来の grp170 40 μg(四角)、腫瘍由来の grp170 20 μg(上向き

き三角)、腫瘍由来の grp170 40 μ g(下向き三角)、及び腫瘍由来の grp170 60 μ g(菱形)で免疫化されたマウスについて、20,000個の colon26 腫瘍細胞で抗原投与後の日数に対してプロットした。

【図 3 A】腫瘍由来の grp110で免疫化後、colon26 腫瘍を生じる Balb/cマウスの生存率を示すプロットである。生存率は、PBS(対照、丸)、肝由来の hsp110 40 μ g(四角)、及び腫瘍由来の hsp110 40 μ g(三角)で免疫化されたマウスへの、腫瘍接種後の日数の閑数としてプロットした。

【図 3 B】腫瘍由来の grp170で免疫化後、colon26 腫瘍を生じる Balb/cマウスの生存率を示すプロットである。生存率は、PBS(対照、丸)、肝由来の grp170 40 μ g(四角)、及び腫瘍由来の grp170 40 μ g(三角)で免疫化されたマウスへの、腫瘍接種後の日数の閑数としてプロットした。

【図 4 A】PBS(対照)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の閑数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図 4 B】MethAで誘導された腫瘍由来の hsp110で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の閑数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図 4 C】MethAで誘導された腫瘍由来の grp170で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の閑数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図 5 A】colon26 腫瘍細胞を標的化する CTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照 T 細胞(丸)、colon26 腫瘍細胞由来の hsp110に対する T 細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来の grp110に対する T 細胞についての、エフェクター：標的の比の閑数としてプロットした。

【図 5 B】colon26 腫瘍細胞を標的化する CTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照 T 細胞(丸)、colon26 腫瘍細胞由来の grp170に対する T 細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来の grp170に対する T 細胞についての、エフェクター：標的の比の閑数としてプロットした。

【図 5 C】MethA腫瘍細胞を標的化する CTLアッセイ法の結果を示すグラフ

である。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のhsp110に対するT細胞についての、エフェクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図5D】MethA腫瘍細胞を標的化するCTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のgrp170に対するT細胞についての、エフェクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図6】grp170によりバルスした樹状細胞(三角)、対照樹状細胞(四角)、又はPBS(丸)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての腫瘍容積(mm^3)を示すグラフである。

【図7】PBS(白丸)、腫瘍由来のgrp170(四角)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のgrp170(上向き三角)、腫瘍由来のhsp110(下向き三角)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のhsp110(菱形)、腫瘍由来のhsp70(六角形)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のhsp70(黒丸)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍容積(mm^3)を示すグラフである。

【図8】ルシフェラーゼと共に、hsp110+hsp70+hsp25のモル比1:1:1:1(四角)、hsp110 1:1(三角)、hsp25 1:1(×)、grp170 1:1(アスターisk)、又はルシフェラーゼ単独(丸)でのインキュベーションに関する、時間(分)の関数としての、タンパク質凝集率(%) (光散乱により決定)を示すグラフである。

【図9A】hsp110複合体の特徴決定のためのFPLC用のサイズ排除カラムにより分離された天然のhsp110のクロマトグラフィープロファイルを示す。Hsp110は、con-Aセファロース及びモノQカラム上での連続クロマトグラフィーにより一部精製した。一緒にした画分は、スーパークロマムに負荷し、各画分のタンパク質を、hsp110、hsc70、及びhsp25(1:1000)の抗体によるイムノブロッティングにより検出した。

【図9B】天然のhsp110の組成分析を示すイムノブロットである。精製したhsp110画分は、hsp90(レーン1、2)、hsc70(レーン3、4)、TCP-1(レーン5、6)、及びhsp25(レーン7、8)の抗体により検出した。更に総細胞抽出物を陽性对照(レーン1、3、5、7)として使用した。

【図10A～C】 hsp110及びhsp70、hsp25の間の相反免疫沈降を示すイムノプロットである。同定された抗体とのイシキュベーション後、プロテインA-セファロースに添加し、かつ更に4℃で一晩イシキュベーションし、hsp110、hsp70、及びhsp25抗体を用いた免疫沈降により試験した。更に総細胞抽出物を陽性对照(レーン1)として使用した。

【図10A】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp110の抗体(1:100)とイシキュベーションした場合に認められた結果を示す。

【図10B】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp70の抗体(1:200)とイシキュベーションした場合に認められた結果を示す。

【図10C】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp25の抗体(1:100)とイシキュベーションした場合に認められた結果を示す。

【図11A】 ルシフエラーゼ及びHspを室温で30分間イシキュベーションし、16,000gで遠心分離後、可溶性画分をセファクリルS-300カラムに負荷した場合に調製されたイムノブロットを示す。溶離された画分を、Hspの抗体及びルシフエラーゼによるイムノブロットにより分析した。

【図11B】 ルシフエラーゼ及びHspを43℃で30分間イシキュベーションし、16,000gで遠心分離後、可溶性画分をセファクリルS-300カラムに負荷した場合に調製されたイムノブロットを示す。溶離された画分を、Hspの抗体及びルシフエラーゼによるイムノブロットにより分析した。

【図12】 hsp110変異体及びhsp70、hsp25のイシビト口における相互作用分析の結果を示す。完全長hsp110(レーン1、4)及び変異体#1(レーン2、5)、変異体#2(レーン3、6)を発現した大腸菌を、hsc70又はhsp25と共に30℃で1時間イシキュベーションし、その後、抗hsc70抗体又は抗hsp25抗体を添加した。免疫沈降物を、抗His抗体で検出した。hsc70及びhsp25の間のイシビト口相互作用も、前述の方法と同じ方法で検出した；hsc70抗体を使用し、免疫沈降物を試験した(レーン8)。総細胞溶解液を、陽性対照(レーン7)として使用した。各アッセイ法には、野生型hsp110、hsp110変異体、hsp70及びhsp25の同量のタンパク質(2μg)が含まれた。

【図13】 her2/neu細胞内ドメイ n(ICD)の抗hsp110抗体及び抗grp170抗

体との、インビトロにおける結合複合体形成後の結果を示す。レーン 1 は 205 kDa～7.4 kDa のタンパク質標準であり；レーン 2 は hsp110+ 抗 hsp110 抗体であります；レーン 3 は hsp110+ ICD であります；レーン 4 は grp110+ ICD であります（結合緩衝液中）；レーン 5 は grp110+ ICD (PBS 中) であります；レーン 6 は ICD であります；並びに、レーン 7 は hsp110 であります。

【図 14】 複合体の抗 hsp110 抗体との免疫沈降後の、新鮮な試料（左側レーン）及び凍結融解試料（中央レーン）中の hsp110-ICD 複合体を示すウエスタンプロットである。右側レーンは ICD である。

【図 15】 美法 ELISA 並びにその HLA-A2 結合親和性及ぶ hsp110 への予想される結合について選択された her-2/neu の 10-mer ペプチドである p546 を用いた hsp-ペプチド結合を示す棒グラフである。ペプチドはビオチン化し、かつ hsp110 とインビトロにおいて混ぜた。精製した混合物濃度は、1 μg/ml (白い棒)、10 μg/ml (斜交平行線の棒)、及び 100 μg/ml (黒い点描の棒) であつた。

【図 16】 新鮮な試料及び凍結融解試料の両方を使用した、ヒト型結核菌抗原 Mtb8.4 及び Mtb39 と抗 hsp110 抗体との、インビトロにおいて結合複合体形成後の免疫沈降の結果を示す。レーン 1 はタンパク質標準 205 kDa～7.4 kDa であります；レーン 2 は hsp110+Mtb8.4 (凍結融解後) であります；レーン 4 は Mtb8.4 であります；レーン 5 は hsp110 であります；レーン 6 は hsp110+Mtb39 であります；レーン 7 は hsp110+Mtb39 であります (凍結融解後)；レーン 8 は Mtb39 であります；並びに、レーン 9 は抗 hsp110 抗体である。

【図 17】 A2/Kb ブラントンスジエニッシュマウス (1 群当たり動物 5 匹) における、組換えマウス hsp110-ICD 複合体 25 μg の腹腔内免疫化後の、T 細胞による IFN-γ ターフエロン (IFN-γ) 産生 (ELISPOT アッセイ法におけるスポット数で決定) を示す棒グラフである。総脾細胞又は枯渇した細胞 (5×10^6 個細胞 / ml) を、25 μg/ml PHA (チエックの棒) 又は 20 μg/ml ICD (黒い点描の棒)と共に、一晩インビトロ培養し、かつ IFN-γ 分泌を ELISPOT アッセイ法を用いて検出した。

【図 18】 IFN-γ 分泌のための ELISPOT アッセイ法における陽性スポット数で決定した、インビトロにおいて再構築された hsp110-ペプチド複合体の免疫原性を示す棒グラフである。組換えハムスター hsp110 (100 μg) を、100 μg の 9-m

r her-2/neuペプチド p369、HLA-A2結合剤と共にイニキュベーションした。8週齢の HLA-A2トランスジェニックマウス($n=4$)を、hsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)又はペプチド単独群(群B、黒い点描の棒)のいずれかで、腹腔内免疫化した。未刺激細胞(陰性対照)の数は、 <40 であり、かつ刺激された細胞数からこれを減じた。

【図19】 IFN- γ 分泌のためのELISPOTアッセイ法における陽性スポット数で決定した、インビトロにおいて再構築されたhsp110+ペプチド複合体の免疫原性を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100 μ g)を、100 μ gの10-mg her-2/neuペプチド p546、HLA-A2結合剤と共にインキュベーションした。8週齢の HLA-A2トランスジェニックマウス($n=2$)を、hsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)又はペプチド単独群(群B、黒い点描の棒)のいずれかで、腹腔内免疫化した。未刺激細胞(陰性対照)の数は、 <40 であり、かつ刺激された細胞数からこれを減じた。

【図20】 hsp110-ICD(her2/neu)複合体で腹腔内免疫化したA2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗hsp110抗体応答を示すグラフである。ELISA Aの結果は、血清及び抗体希釈率の関数として450nmでの光学密度(OD)に対するプロットした。結果は、抗hsp110の陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、及び0日目の血清(黒丸)、14日目(白四角、破線)、及び28日目(白四角、実線)について示した。これらの結果は、マウスがhsp110に対する自己免疫応答を生じていないことを確認している。

【図21】 hsp110-ICD複合体で腹腔内免疫化したA2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗ICD抗体応答を示すグラフである。ELISAの結果は、血清及び抗体希釈率の関数として450nmでの光学密度(OD)に対するプロットした。結果は、抗ICDの陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、及び0日目の血清(黒丸)、14日目(白四角、破線)、及び28日目(白四角、実線)について示した。これらの結果は、マウスが、ストレスタンパク質複合体による免疫化後、her2/neuのICDに対する特異的抗体応答を生じたことを確認している。

【図22】 様々なワクチン製剤で初回刺激して2週間後の、A2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗ICD抗体応答を比較する棒グラフである。結

果は、血清及び抗体希釈率の閾数として450nmでのODに対してプロットし、かつ棒は、hsp110-ICD(点描の棒)；フロイント完全アジュバント中のICD陽性対照(チエックの棒)、ICD単独(斜交平行線の棒)、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、及び非関連抗体の陰性対照(白い棒)で初回刺激した動物のデータを示す。

【図23】 hsp110-ICD複合体でA2/Kbトランクエニシックを皮下又は腹腔内へ初回刺激して2週間後の、特異的抗ICD抗体産生を比較する棒グラフである。結果は、様々な血清及び抗体希釈率の閾数として450nmでのODに対してプロットし、かつ棒は、0日目の血清(点描の棒)、腹腔内14日目の血清(チエックの棒)、皮下14日目の血清(斜交平行線の棒)、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、及び非関連抗体の陰性対照(白い棒)を示す。

【図24 A】 hsp110をコードしているベクターでトランクエクエクションされたcolon26細胞(CT26)が、非トランクエクシヨンCT26細胞及び空のベクターでトランクエクシヨンされたCT26細胞と比較して、増大したhsp110発現を示すことを示すイムノプロットである。CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、及びCT26-hsp110(レーン3)からの同等のタンパク質試料に、10% SDS PAGEを行い、かつイモビロン(immobilon)-Pメンブレン上に移した。メンブレンを、hap110に対する抗体でプロービングした。洗浄後、メンブレンを、TBST中に1:2,000稀釀した西洋ワササビペルオキシダーゼに複合したヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgGと共にインキユベーショングリセラート。免疫反応性を化学発光増幅検出システムを用いて検出した。

【図24 B】 CT26-hsp110細胞は、非トランクエクシヨンCT26細胞及び空のベクターでトランクエクシヨンされたCT26細胞と比較して、増強されたhsc70発現を示さないことを示す。CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、及びCT26-hsp110(レーン3)からの同等のタンパク質試料は、hsc/hsp70に対する抗体でメンブレンをプロービングした以外は、図24Aのように調製した。

【図25 A】 CT26細胞中のhsp110の免疫蛍光染色を示す、光学顕微鏡写真である。細胞を、染色の1日前に、カバースリップ上に播種した。その後カバースリップを、ウサギ抗hsp110抗体(1:500希釈)と共にインキユベーショングリセラート。引き続きたFITC標識したアイヌ抗ウサギIgG染色した。正常なウサギIgGを陰性対照とし

て使用した。

【図25B】空のベクターでトランスクエクションされたCT26細胞中のhsp110の免疫蛍光染色を示す光学顕微鏡写真である。細胞は、図25Aのように調製しかつ免疫染色した。

【図25C】hsp110を過剰発現している細胞中のhsp110の免疫蛍光染色した。示す光学顕微鏡写真である。細胞は、図25Aのように調製しかつ免疫染色した。

【図26】播種後1～5日間の細胞数としてプロットした、野生型及びhsp110によりトランスクエクションされた細胞株のインビトロ増殖特性を表すグラフである。細胞は1ウエルあたり 2×10^4 個の密度で播種した。24時間後、細胞を計数した(0日目に相当)。3つ組のウエルから細胞数を指定した日に計数した。結果は、野生型CT26細胞(丸)、空のベクターでトランスクエクションされたCT26細胞(四角)、及びhsp110トランスクエクションされたCT26細胞(三角)を用いた3回の独立した実験の平均±SDである。

【図27】hsp110の過剰発現の軟塞天中のコロニー形成能への作用を示す棒グラフである。野生型CT26細胞、空のベクターでトランスクエクションされたCT26-ベクター細胞及びhsp110を過剰発現しているCT26-hsp110細胞を、0.3%寒天中に播種し、かつ軟塞天中のそれらのコロニー形成能を分析した(≥ 0.2 。スチューデントt検定により解析し、CT26-ベクターと比べ、 $P < 0.05$ であった。

【図28】野生型及びhsp110トランスクエクションされた細胞株のインビオ増殖特性を表すグラフである。細胞 5×10^4 個を、ballb/cマウスの脇腹領域に皮下接種した。腫瘍容積(mm^3)を、野生型CT26細胞(丸)、空のベクターでトランスクエクションされたCT26細胞(四角)、hsp110でトランスクエクションされたCT26細胞、 5×10^4 個(上向き三角)、及びhsp110でトランスクエクションされたCT26細胞、 5×10^5 個(下向き三角)について、腫瘍移植後の日数の関数としてプロットした。

【図29】放射線照射したhsp110過剰発現細胞の注射の、生存CT26細胞による抗原投与に対する反応への作用を示すプロットである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射した(9,000rad)CT26-hsp110細胞を、左脇腹に皮下注射した。2週間

後、マウスを、生存 CT26 細胞で右脇腹に抗原投与した。結果は、PBSで免疫化しかかつ 5×10^4 個の CT26 細胞（丸）；空のベクターを伴う放射線照射した CT26 細胞 / 5×10^4 個の CT26 細胞（四角）；空のベクターを伴う放射線照射した CT26 細胞 / 5×10^4 個の CT26 細胞（上向き三角）；放射線照射した CT26-hsp110 細胞 / 5×10^4 個の CT26 細胞（下向き三角）；及び、放射線照射した CT26-hsp110 細胞 / 5×10^4 個の CT26 細胞（菱形）で抗原投与したマウスについて、腫瘍抗原投与後の日数の関数として、腫瘍を有さないマウスの割合としてプロットした。

【図 30】腫瘍由来の hsp110 による免疫化により誘起された腫瘍特異性 CTL 反応を示すグラフである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射した (9,000 rad) CT26-空ベクター細胞及び CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2 週間後、エフェクター細胞として、脾細胞を単離し、かつ放射線照射した colo126 で、イニビトロにおいて 5 日間再刺激した。リンパ球を、⁵Cr-標識した colo126 を標的細胞として用い、細胞傷害性活性について分析した。この実験では、MethA 腫瘍細胞も標的として用い、かつ細胞溶解は認められなかつた。結果は、対照（丸）、放射線照射した CT26 細胞（四角）、及び放射線照射した CT26-hsp110 細胞（三角）について、エフェクター：標的比の関数として、特異的溶解率（%）をプロットした。

【図 31】放射線照射した hsp110-過剰発現細胞による免疫化後の、CT26 細胞に対する抗体反応を示すグラフである。マウスには、 5×10^5 個の放射線照射した (9,000 rad) CT26-空ベクター細胞及び CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2 週間後、血清を収集し、かつ ELISA を用いて抗体反応をアッセイした。結果は、対照（丸）、CT26-空ベクター（四角）、及び CT26-hsp110（三角）についての血清希釈の関数として、450 nm の OD をプロットした。

【図 32】hsp110 過剰発現細胞の増殖に対する、バイスタンダー (bystander) 細胞由来の GM-CSF の作用を示している。マウスには、下記の 5×10^4 個の生存腫瘍細胞を皮下注射した： CT26-空ベクター細胞（丸）、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射した B78H1GM-CSF 細胞（比 2:1；四角）、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射した B78H1GM-CSF 細胞（比 2:1；上向き三角）； CT26-hsp110 細胞（下向き三角）； CT26-hsp110 細胞（比 2:1；菱形）。B78H1GM-CSF は、CM-CSF 遺伝子でト

ラニスフェクションされたB16細胞であり、B78H1は、野生型細胞である。腫瘍増殖は、腫瘍サイズを測定することにより記録し、かつ移植後日の日数の関数としての腫瘍容積(mm^3)をプロットした。

【図33】放射線照射したhsp110を過剰発現している腫瘍ワクチン及びGM-CSFを分泌しているバイオスタンダード細胞の同時注射の、野生型CT26腫瘍細胞抗原投与の反応に対する作用を示すグラフである。マウスは、以下のようなく、放射線照射した 5×10^5 個の腫瘍細胞により皮下に免疫化した: CT26-空のベクター一細胞、CT26-ベクター一細胞+B78H1GM-CSF細胞(比2:1; 四角)、CT26-hsp110細胞+B78H1GM-CSF細胞(比2:1; 上向き三角)、CT26-hsp110細胞(下向き三角)、CT26-hsp110+B78H1細胞(2:1; 菱形)。更に、PBS(丸)のみで免疫化したマウスについての結果も示す。マウスは、個別の部位を、CT26野生型細胞で抗原投与し、かつ腫瘍出現について1日おきにモニタリングした。結果は、腫瘍抗原投与後の指定日に腫瘍を有さないマウスの割合としてプロットした。

【図34】colon26由来のhsp110又はgrp170による免疫化が、インターフェロン(IFN) γ 分泌を刺激することを示す棒グラフである。マウスをhsp110又はgrp170で免疫化して1週間後、ELISPOTアッセイ法のために脾細胞単離した。植物凝集素(PHA)処理したリシンパ球を陽性対照として用いた。

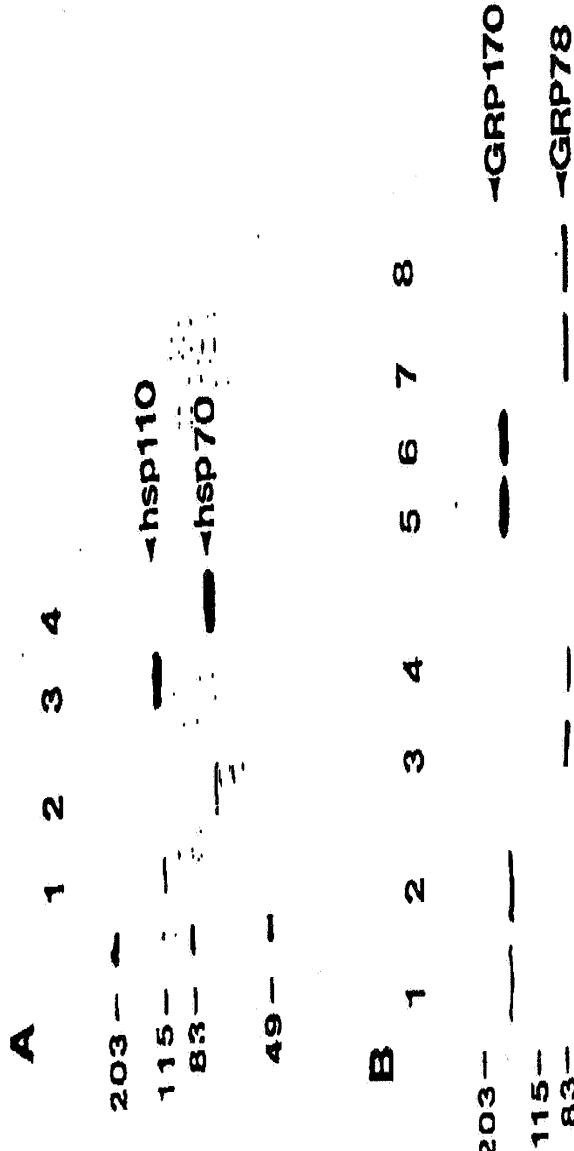
【図35】B16F10腫瘍由来のgrp170による免疫化により誘起された腫瘍特異性CTL反応を示すグラフである。マウスは、grp170(40 μg)で1週間間隔で2回免疫化した。2回目の免疫化の1週間後、脾細胞をエフェクター細胞として単離し、かつ放射線照射したB16F10細胞でインビクト口において5日間再刺激した。リンパ球を、⁵¹Cr標識B16F10又はMetaを標的細胞として用い、細胞傷害活性について分析した。結果を、対照(丸)、肝由来のgrp170(四角)、B16F10由来のgrp170(上向き三角)、及びMeth A由来のgrp170(下向き三角)についてのエフェクター:標的の比の関数として、特異的溶解率(%)をプロットした。

【図36】B16F10由来のgrp170による免疫化は、IFN γ の分泌を刺激することを示している。マウスをhsp110又はgrp170で免疫化した1週間後、脾細胞をELISPOTアッセイ法のために単離した。

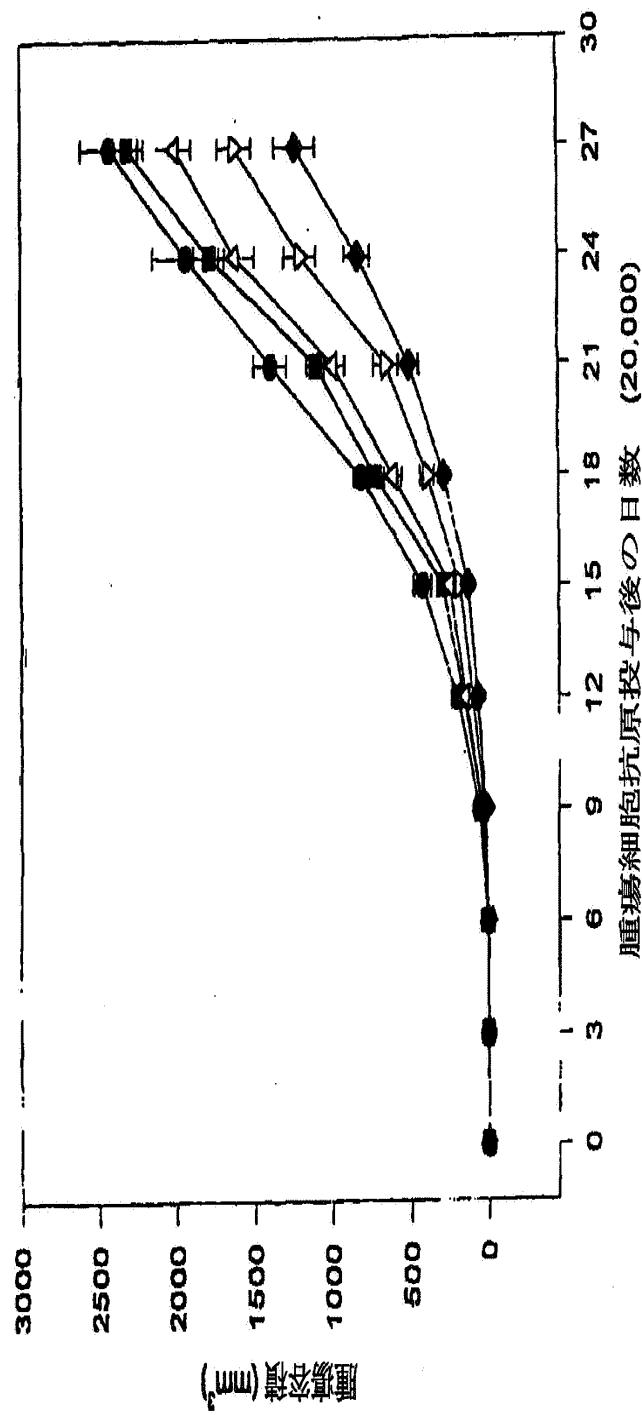
【図37】C57BL/6マウスについての、 1×10^6 個のB16F10細胞を各マウスの

尾静脈へ静脈内接種した場合の肺転移を示している。腫瘍細胞注射後24時間で、マウスをPBS(黒丸)、肝由來のgrp170(白丸)、又は腫瘍由來のgrp170(40μg)で処置した。全部のプロトコールの間に、処置を3回行つた。動物は腫瘍注射の3週間後に屠殺し、肺を摘出し、かつ表面コロニー数を数えた。

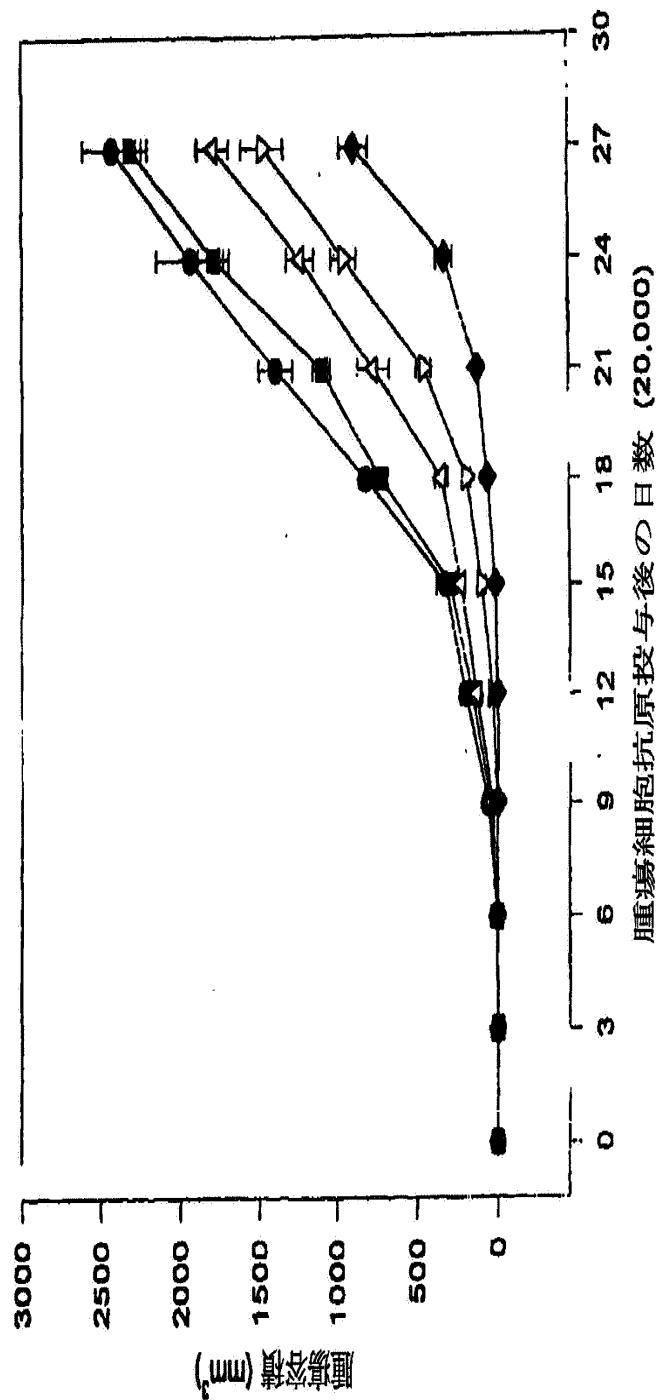
[図 1]



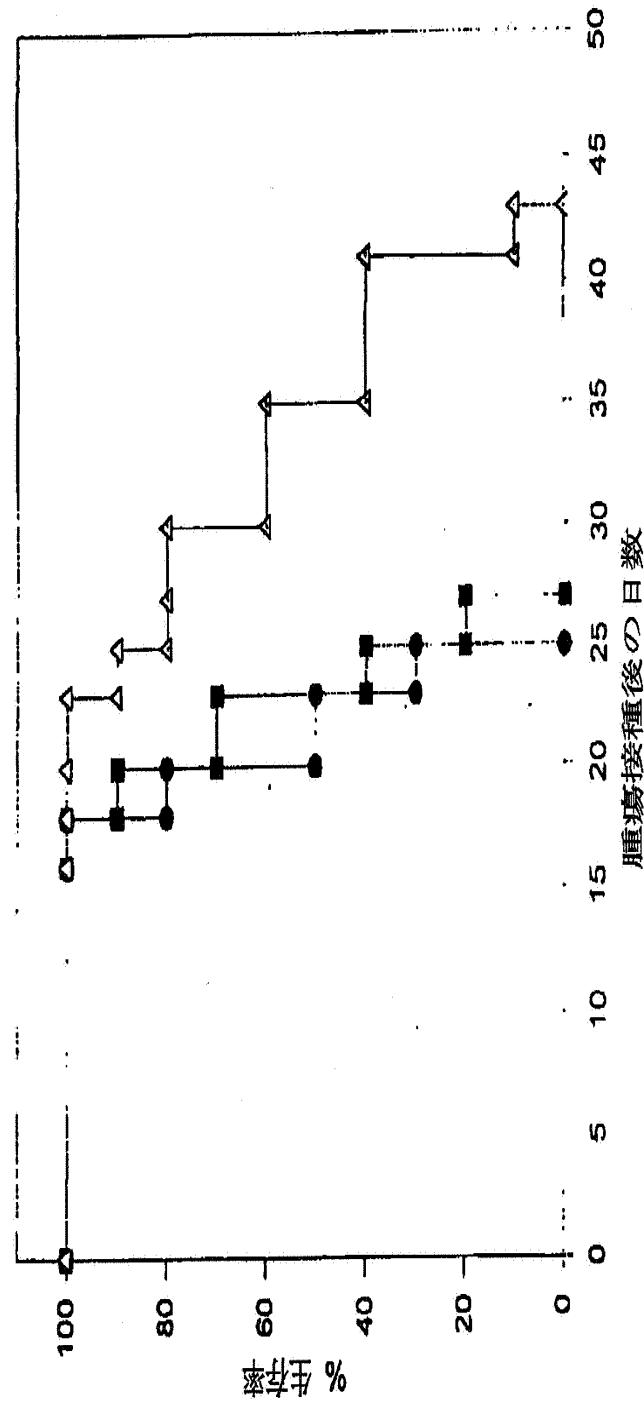
【図2△】



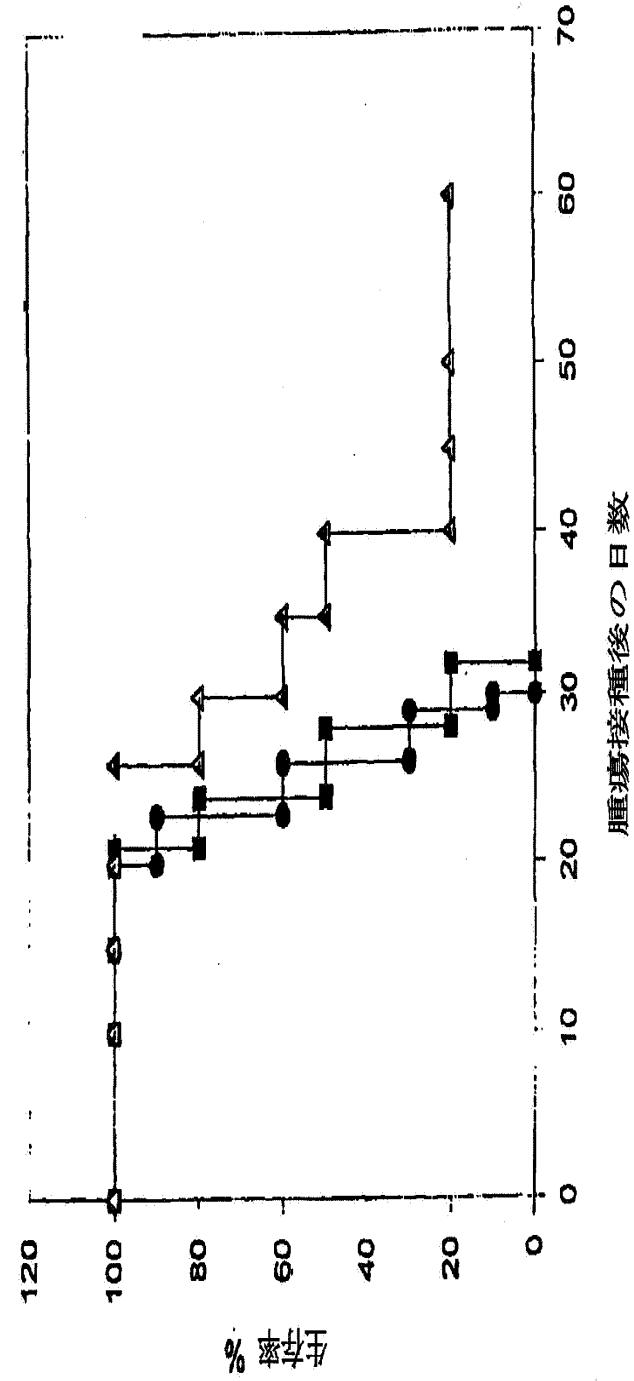
【図2B】



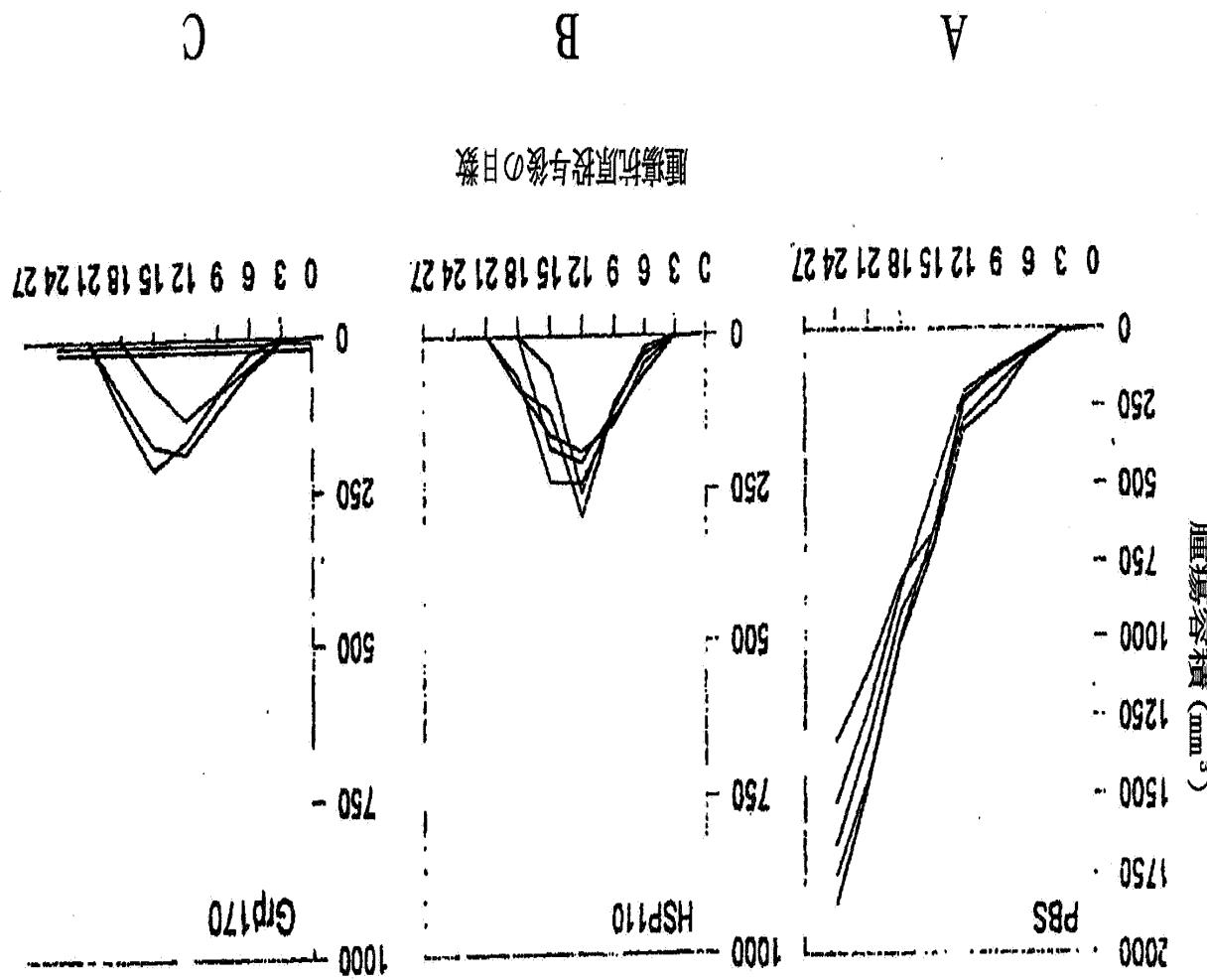
[図 3 A]



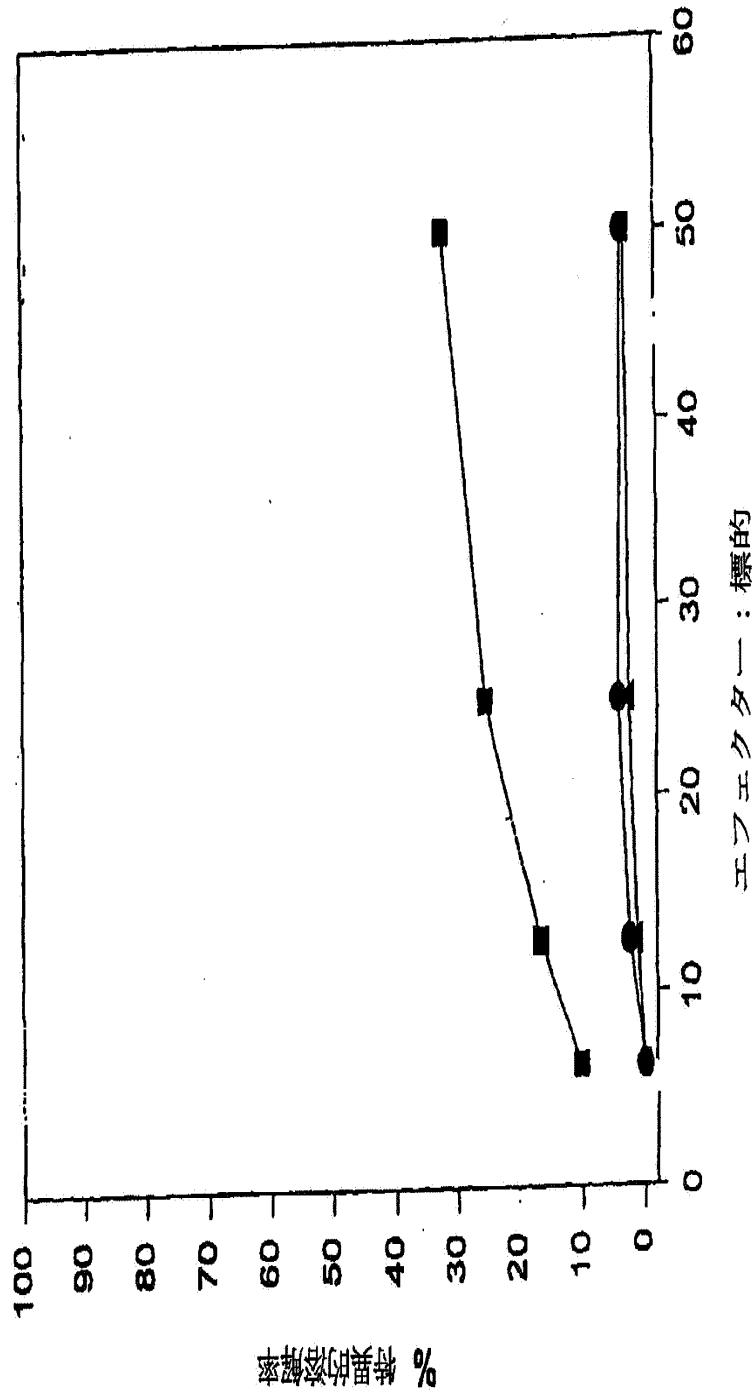
[図 3 B]



【図4】

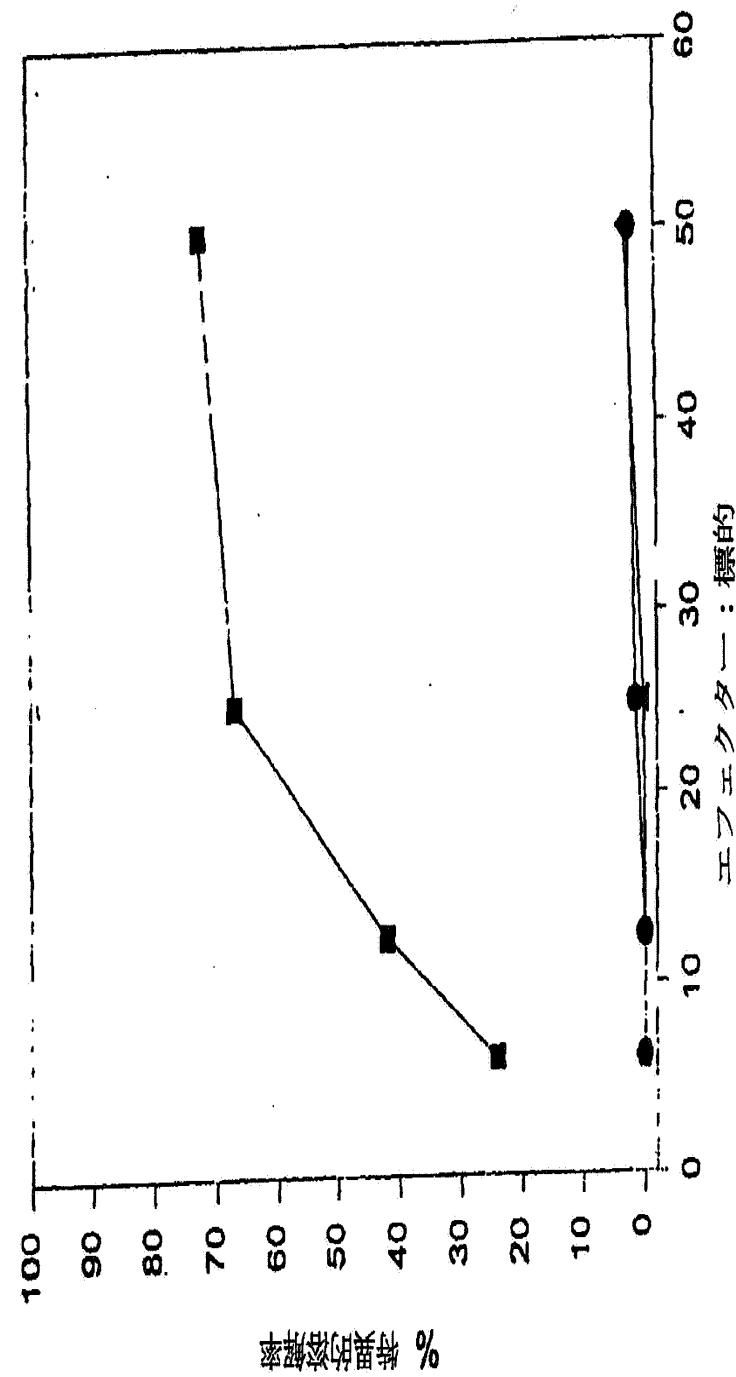


〔図 5 A〕

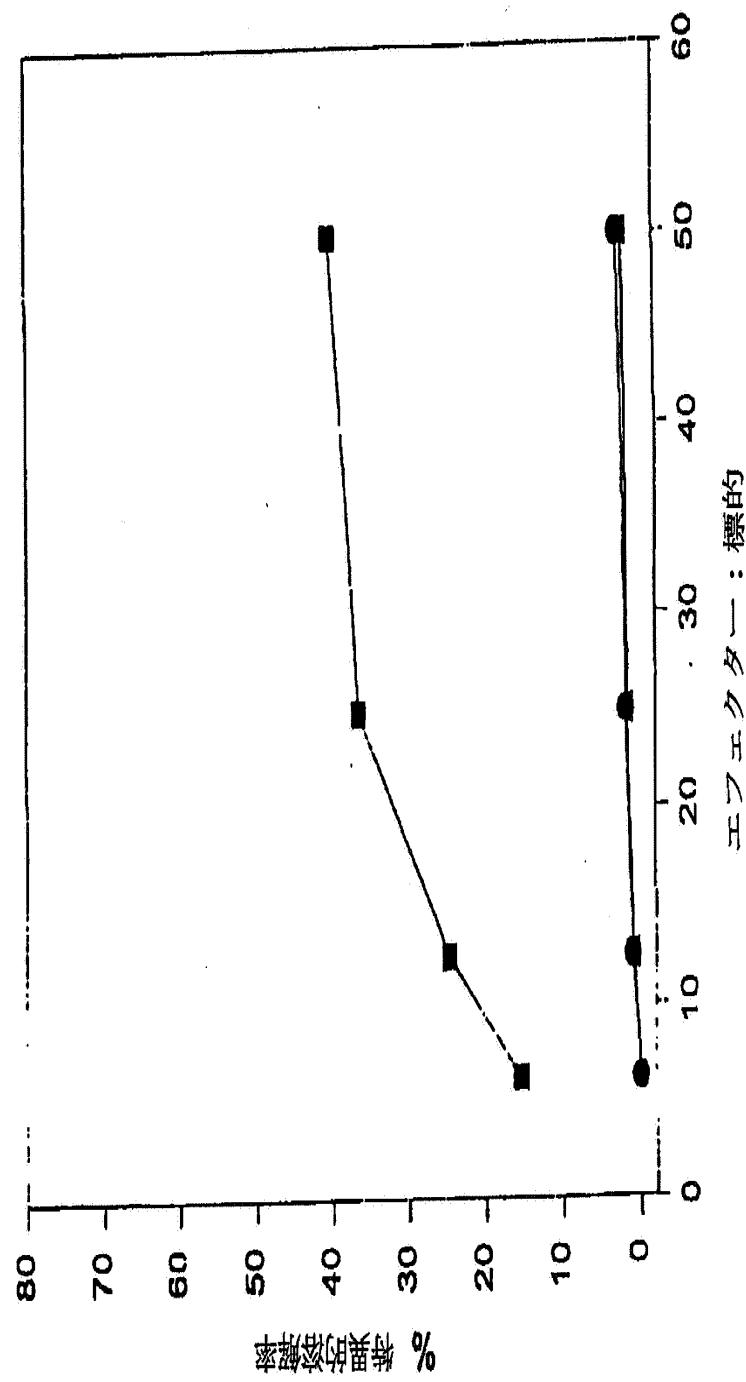


エフェクター：標的

[図 5 B]

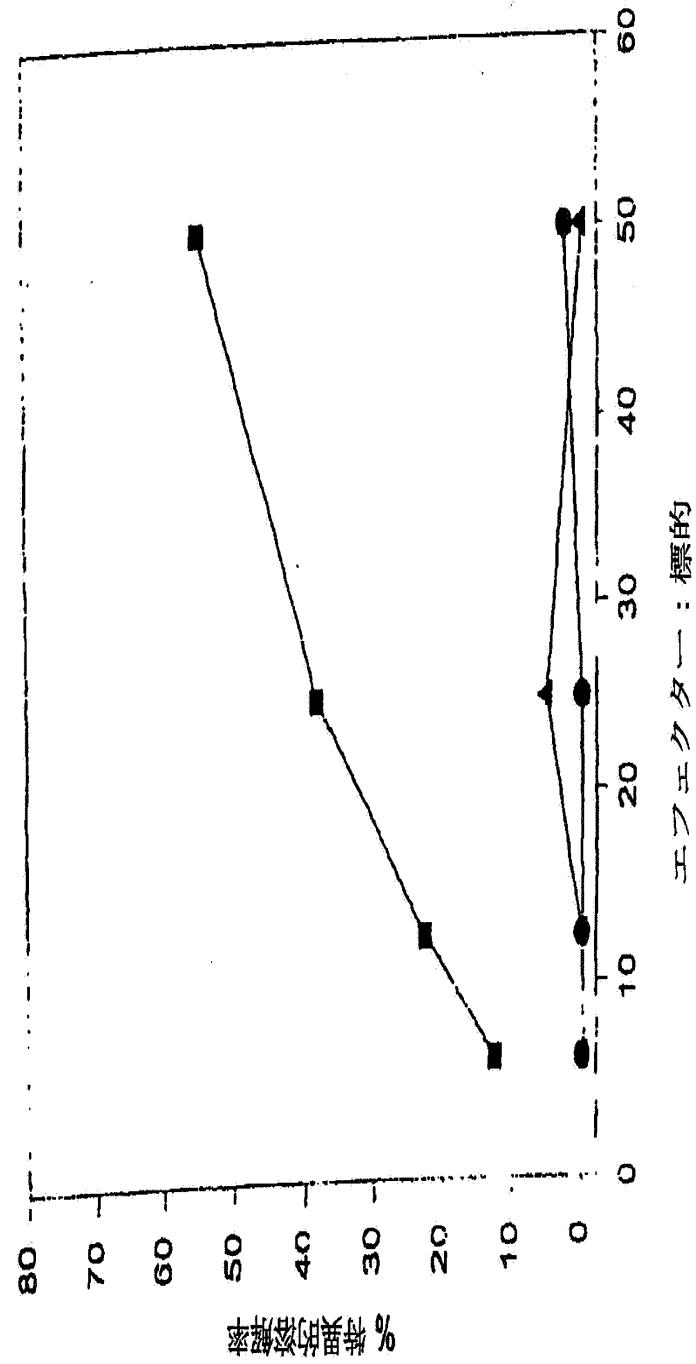


【図5C】



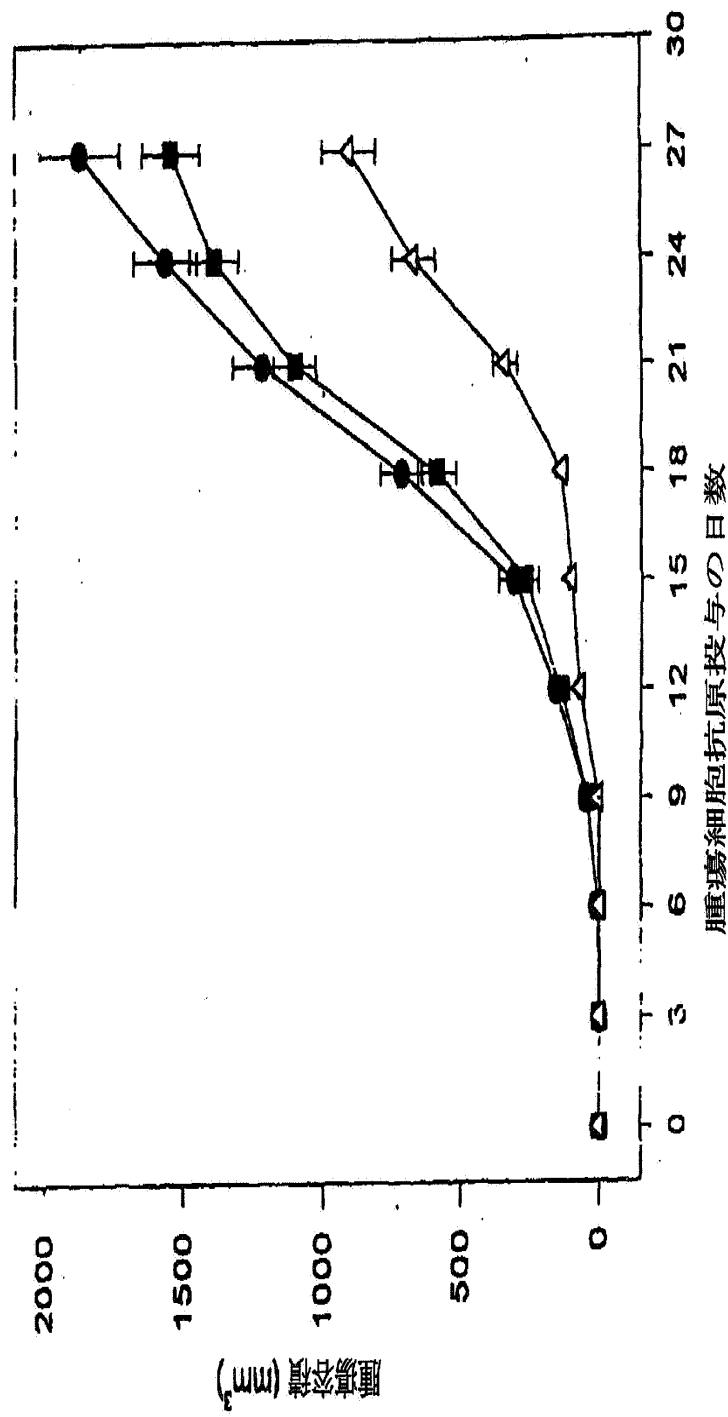
エフェクター：標的

[図 5 D]

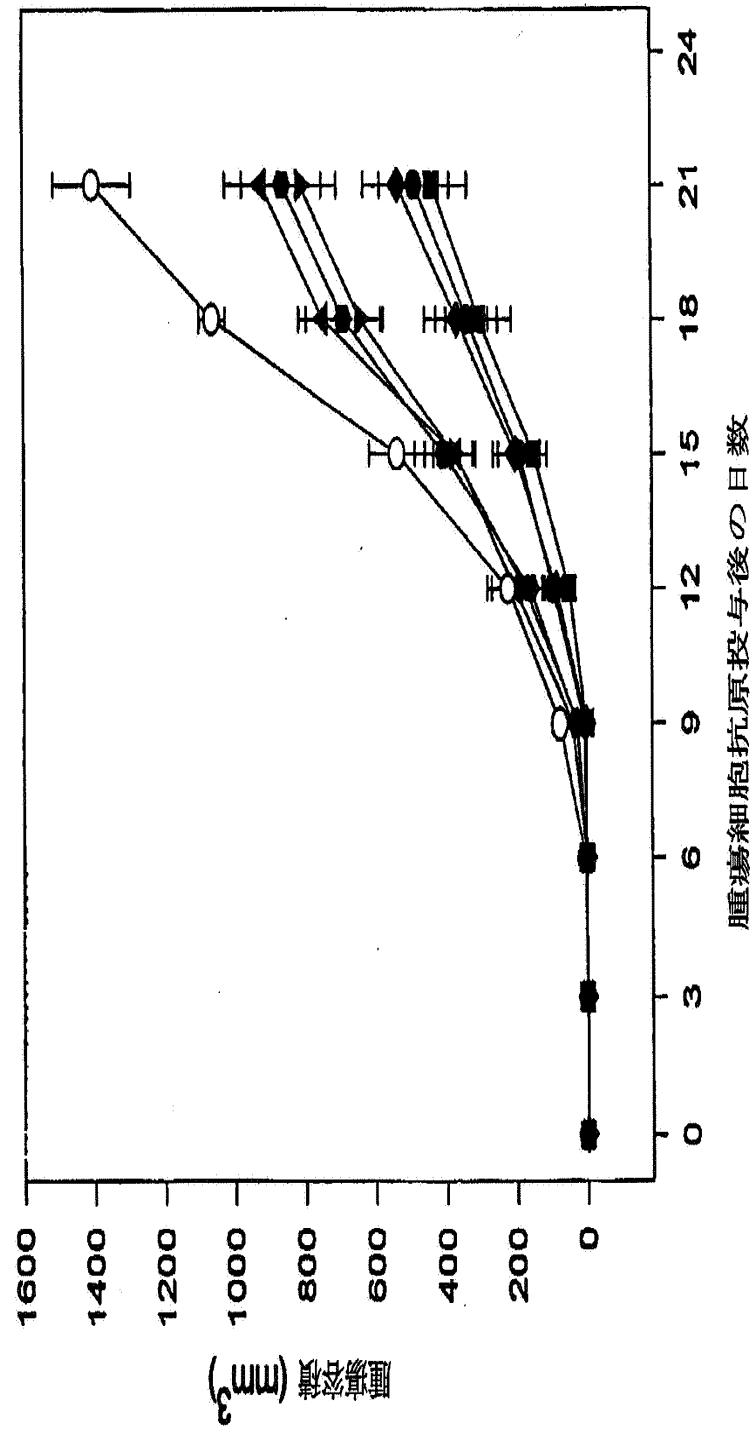


エフェクター：標的

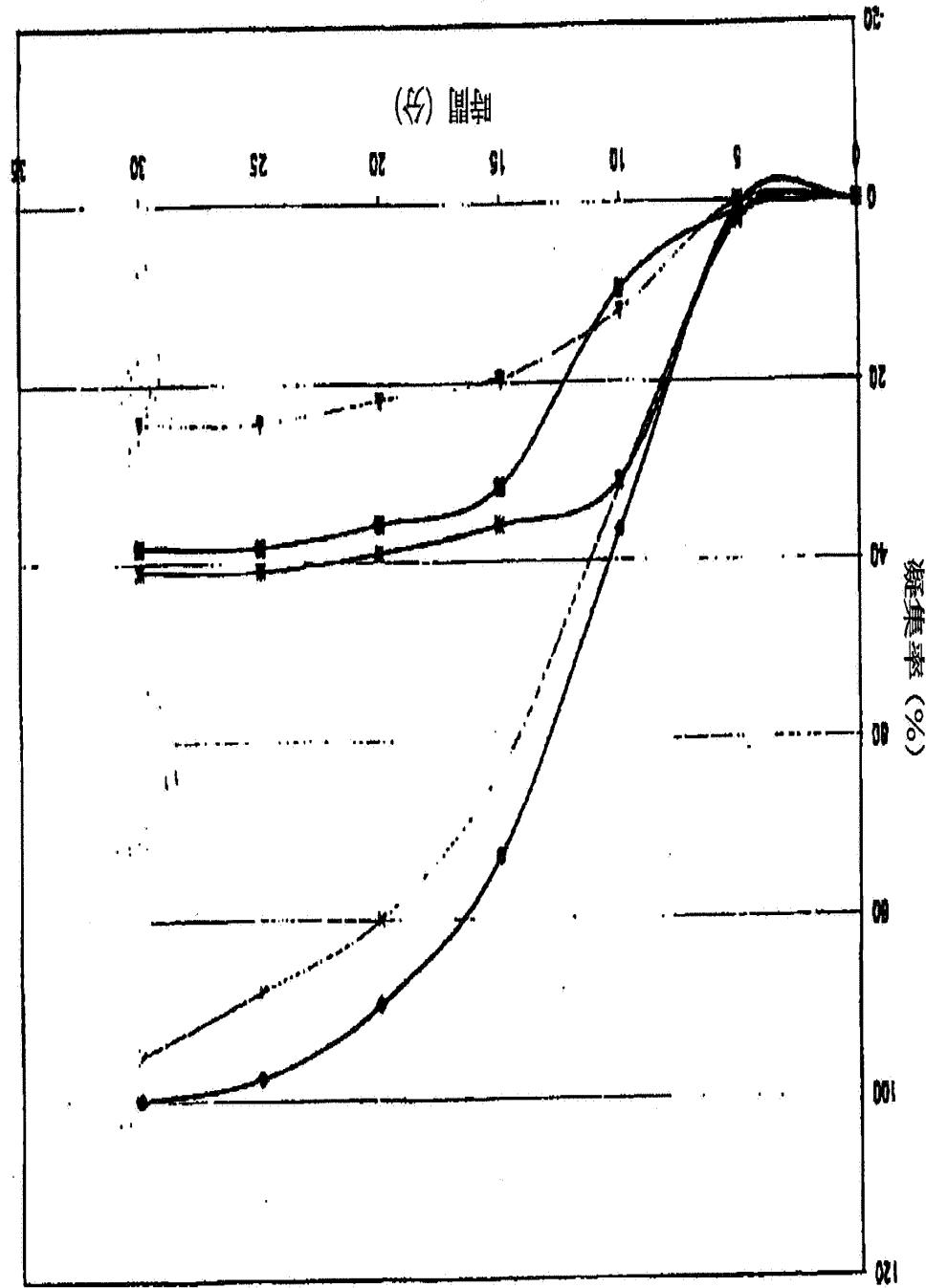
[図 6]

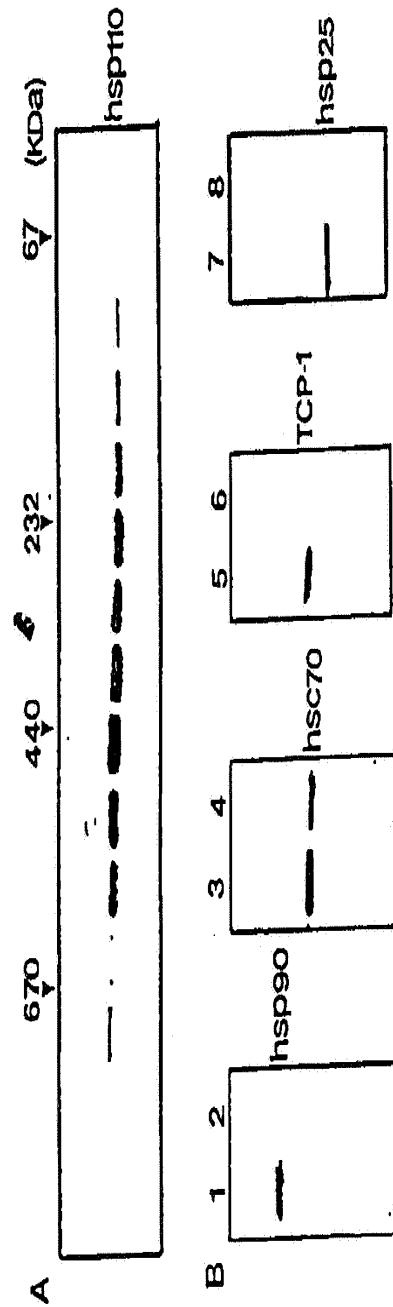


[図 7]



[図8]





〔図10〕

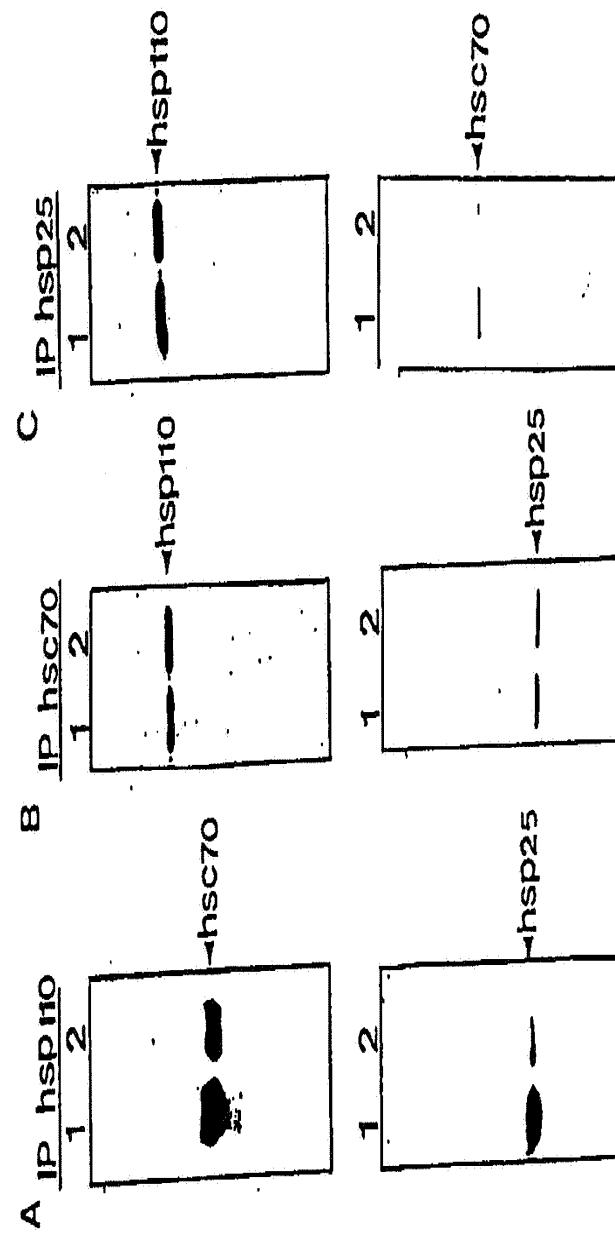
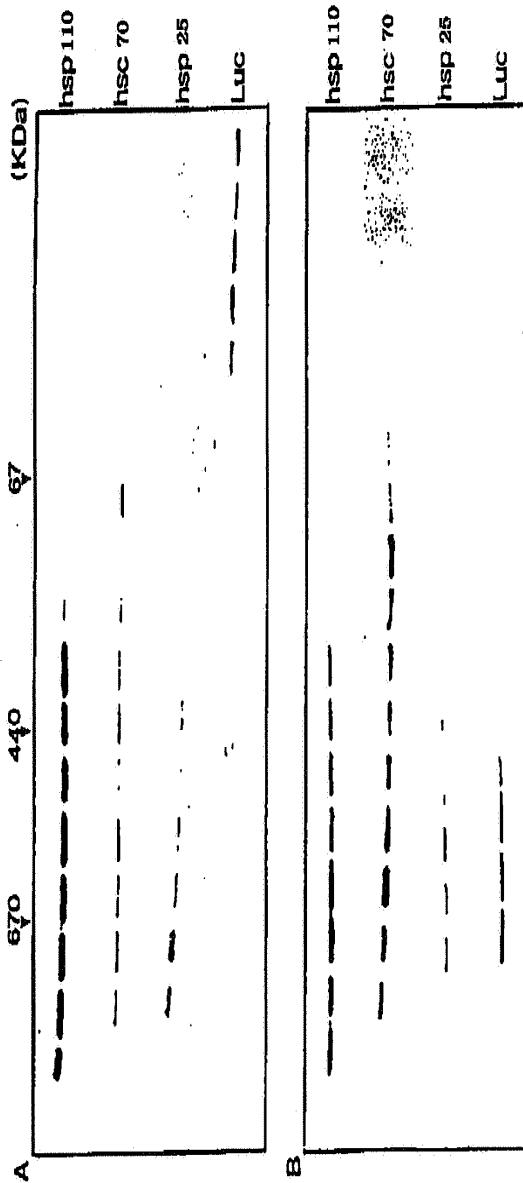
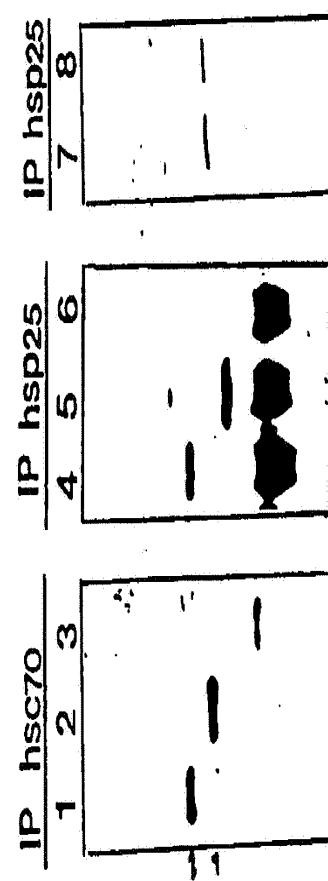


图 1-1-1



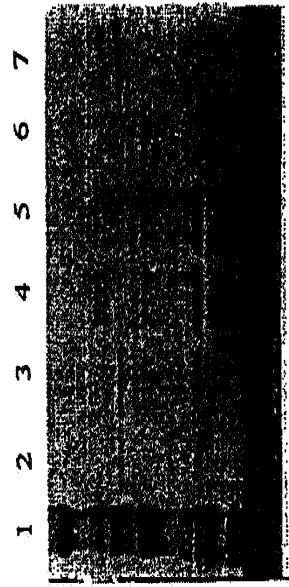
卷之二



(104)

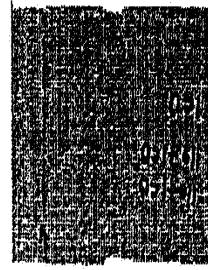
特表 2003-510334

[図 1 3]

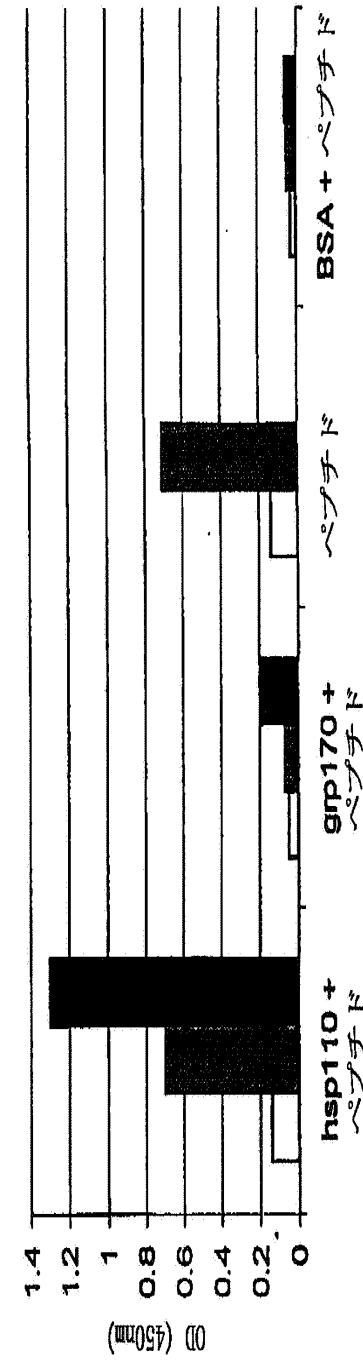


1 2 3 4 5 6 7

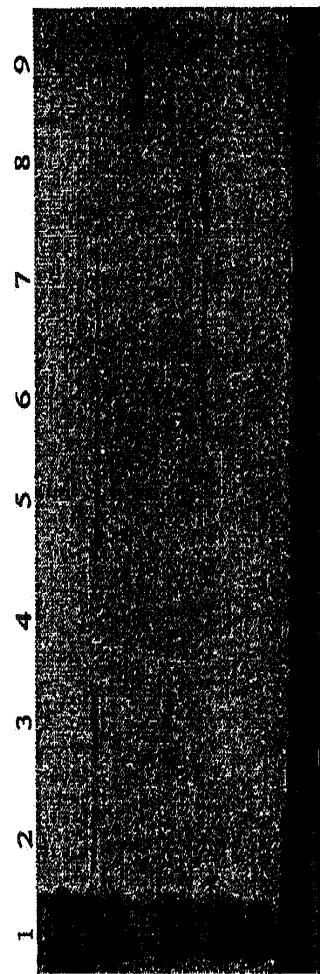
[図 1 4]



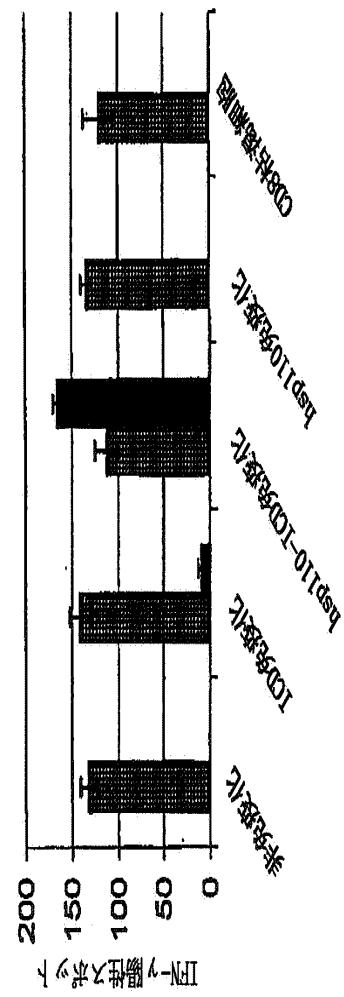
[図 1 5]



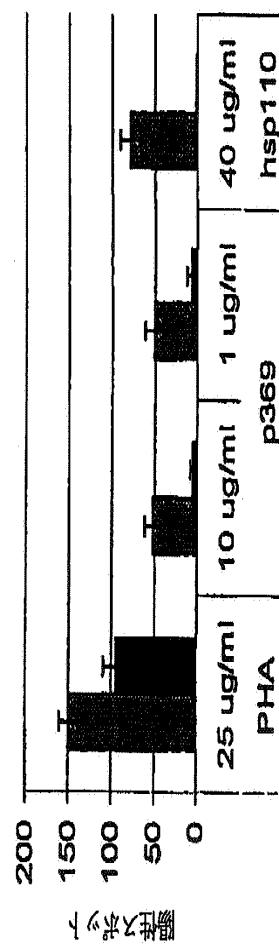
[図 1 6]



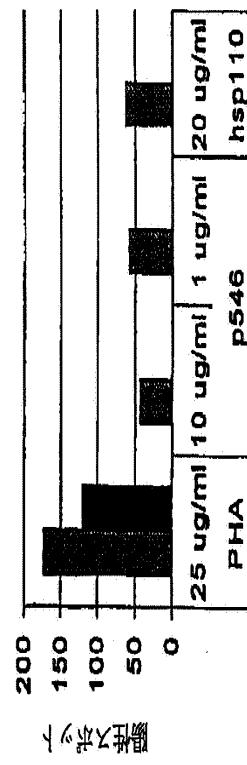
[図 1 7]



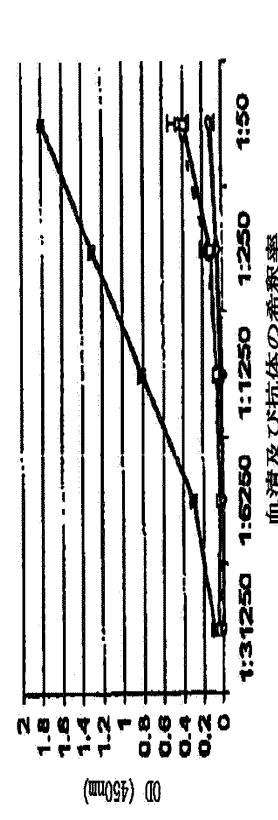
[図 1 8]



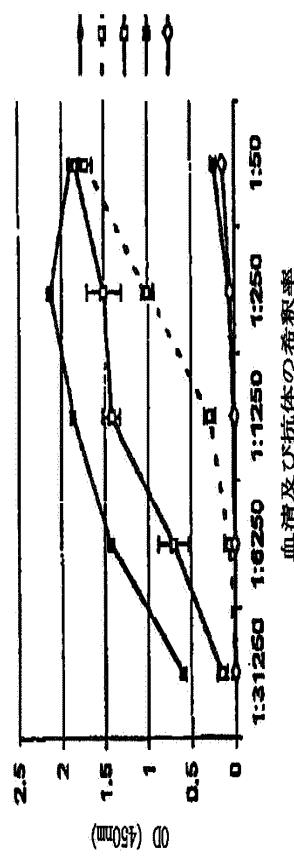
【図19】



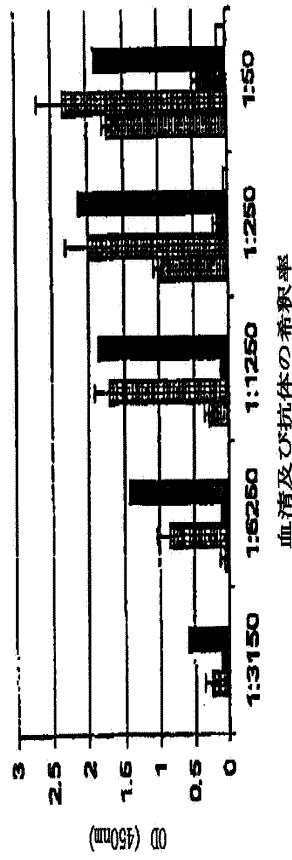
【図20】



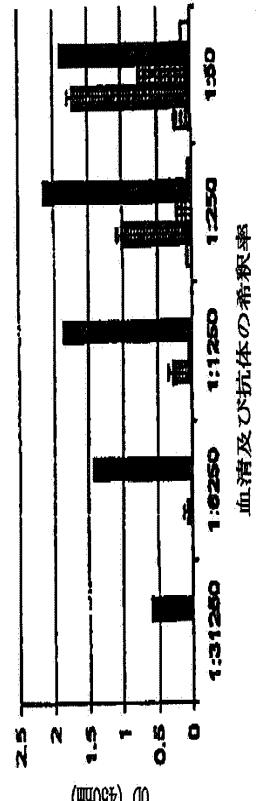
【図21】



卷二



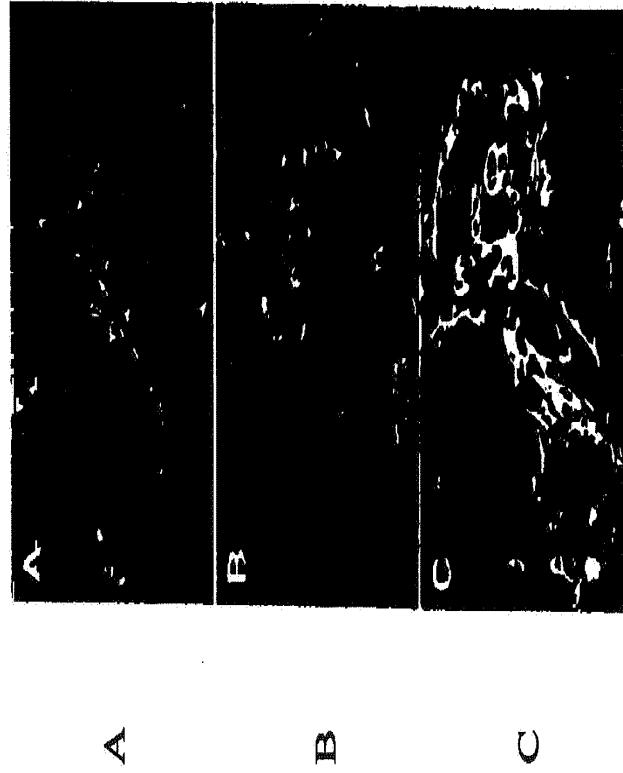
1 2 3 4



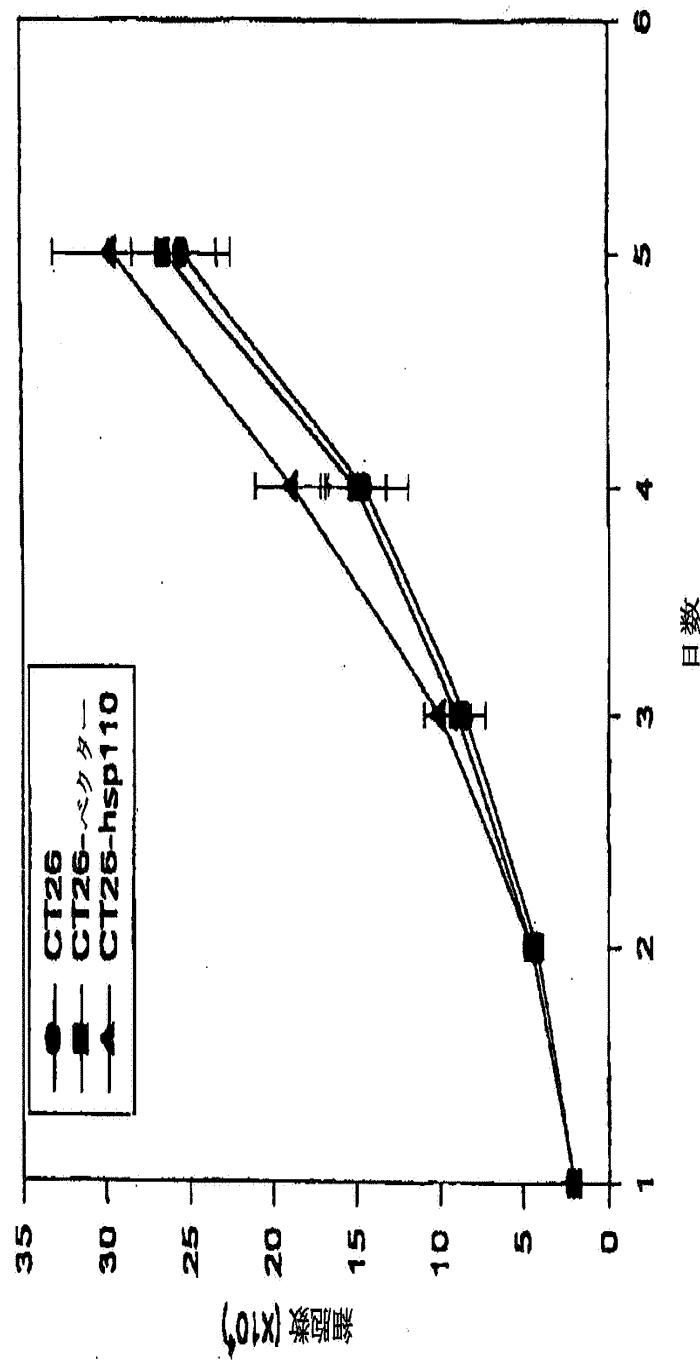
[図 24]

The diagram illustrates the presence or absence of various proteins in A and B cells. In A cells, bands are visible for hsp110 (~203 kDa), hsc70 (~115 kDa), and a fragment (~83 kDa). In B cells, bands are visible for hsc70 (~115 kDa), hsc70 (~83 kDa), and a fragment (~49 kDa).

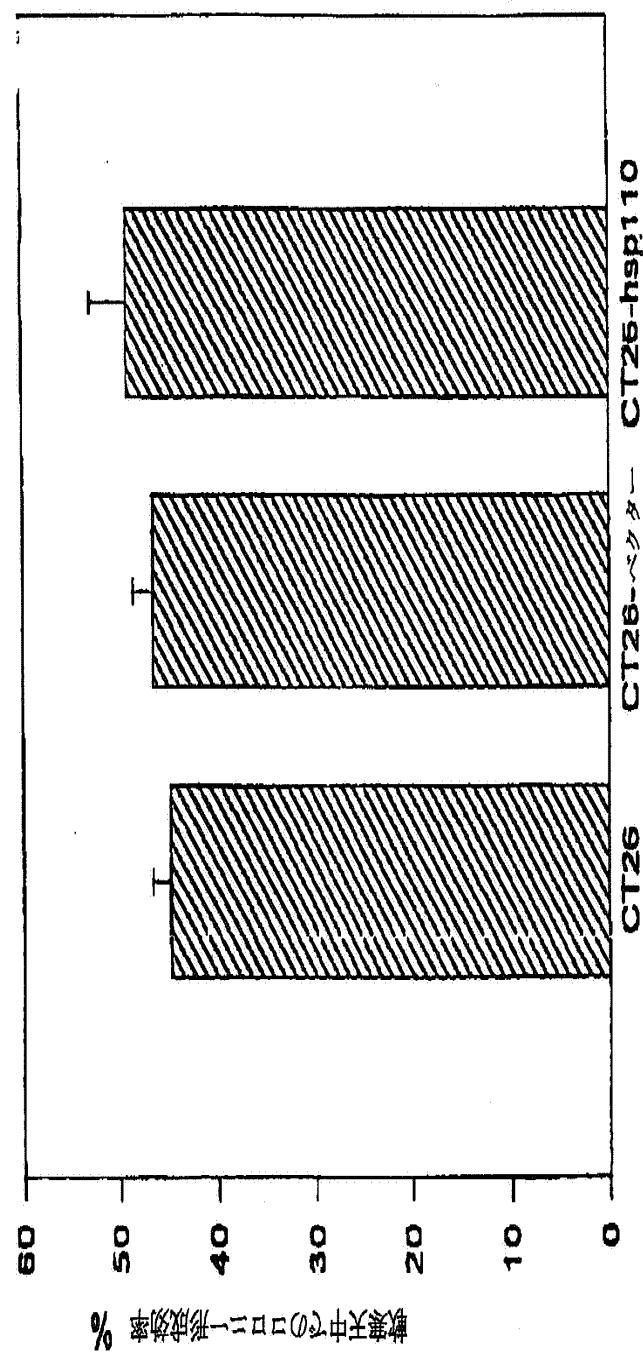
〔 図 25 〕



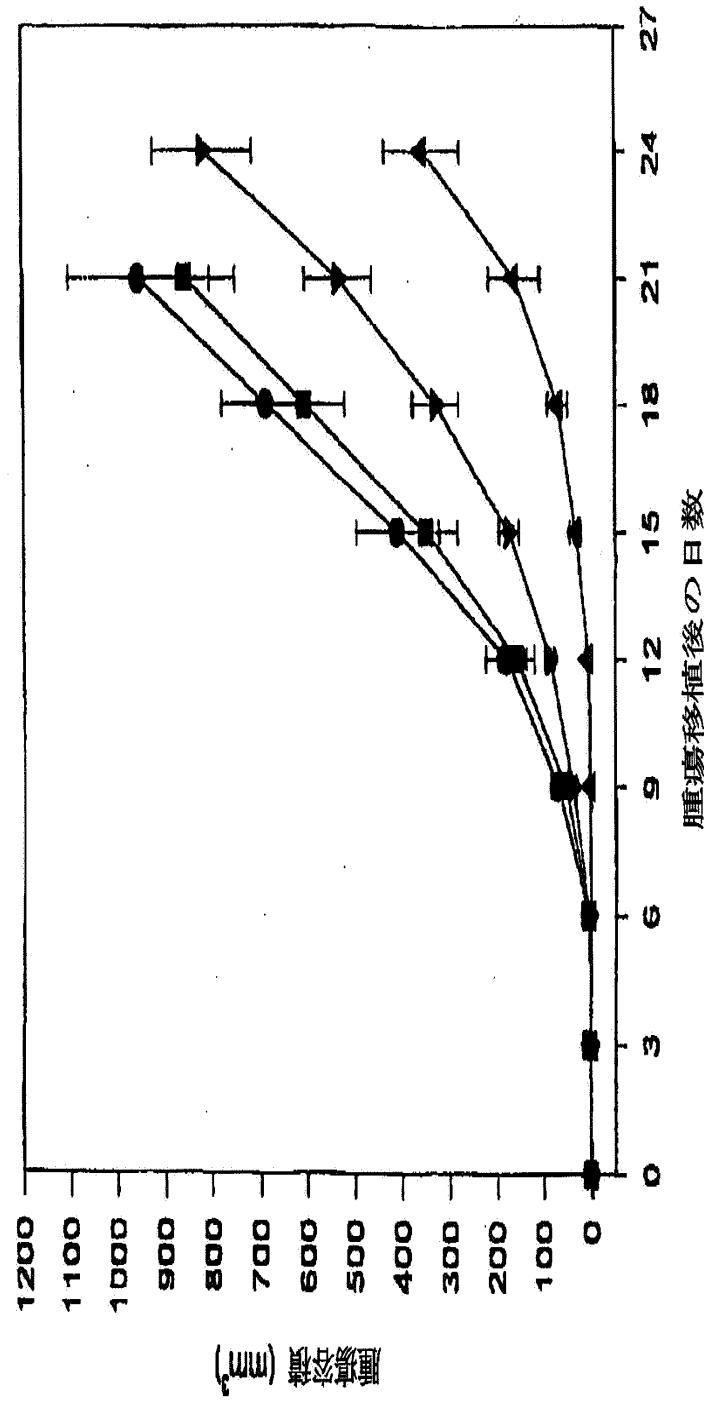
[図 2 6]



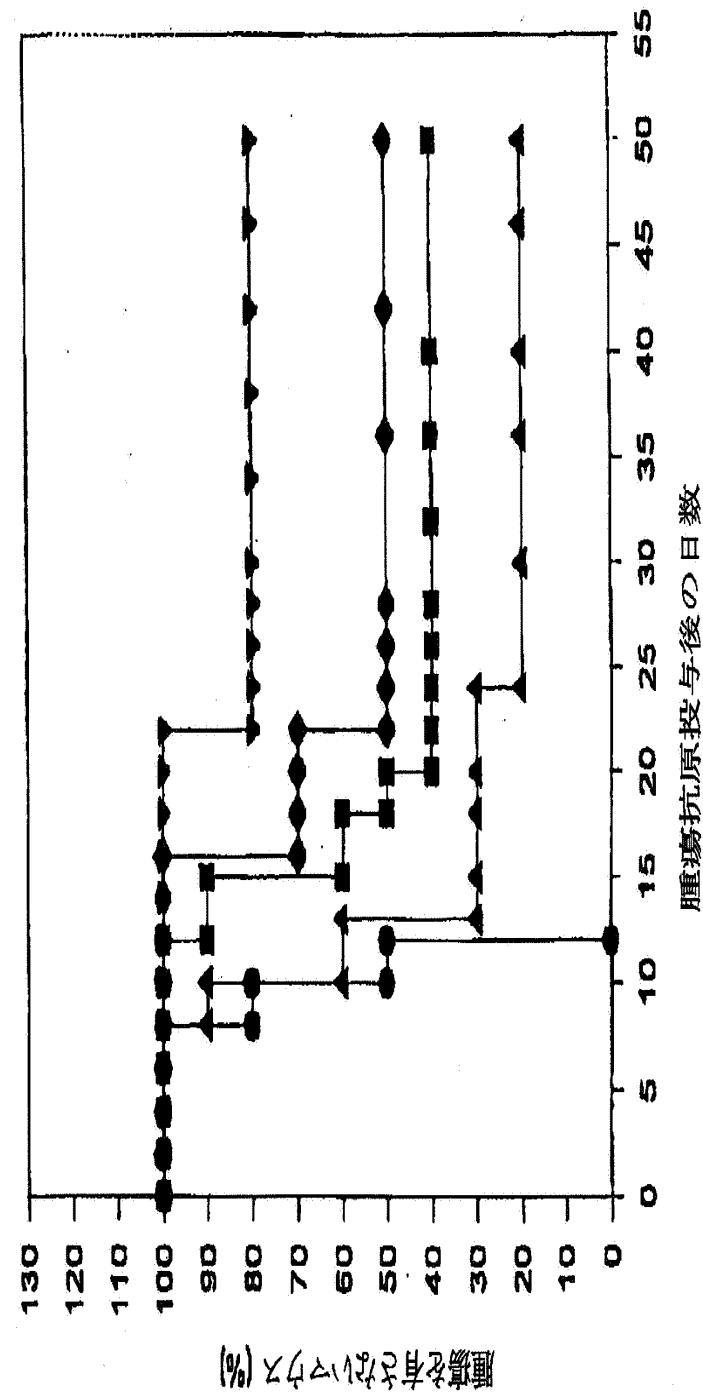
[図 27]



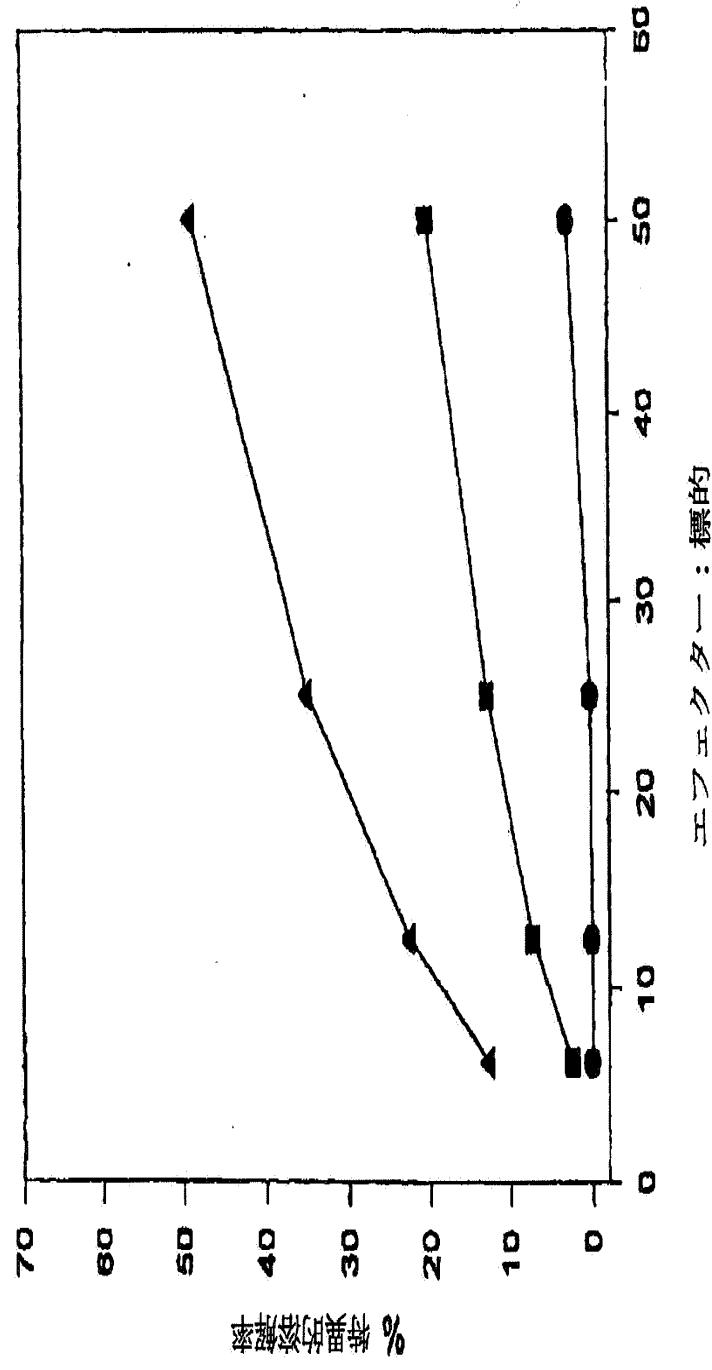
[図 28]



[図 29]

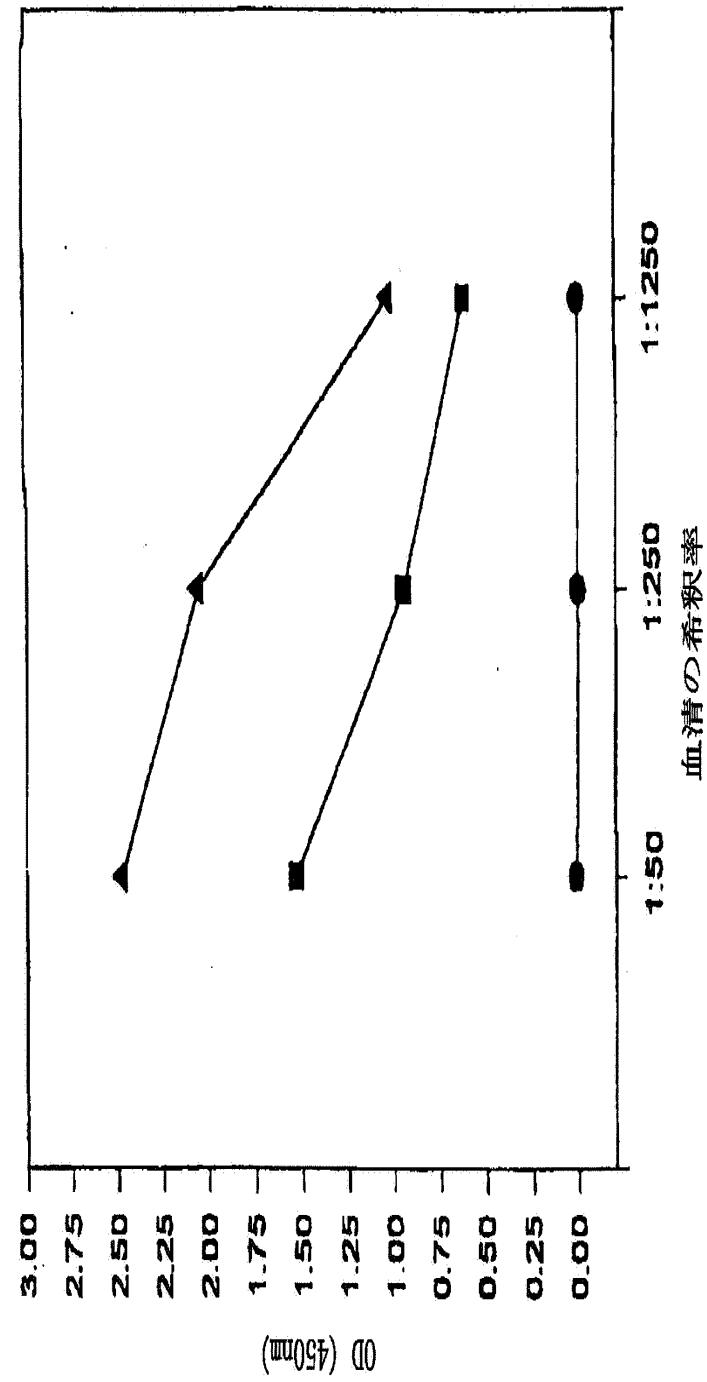


〔図 30〕

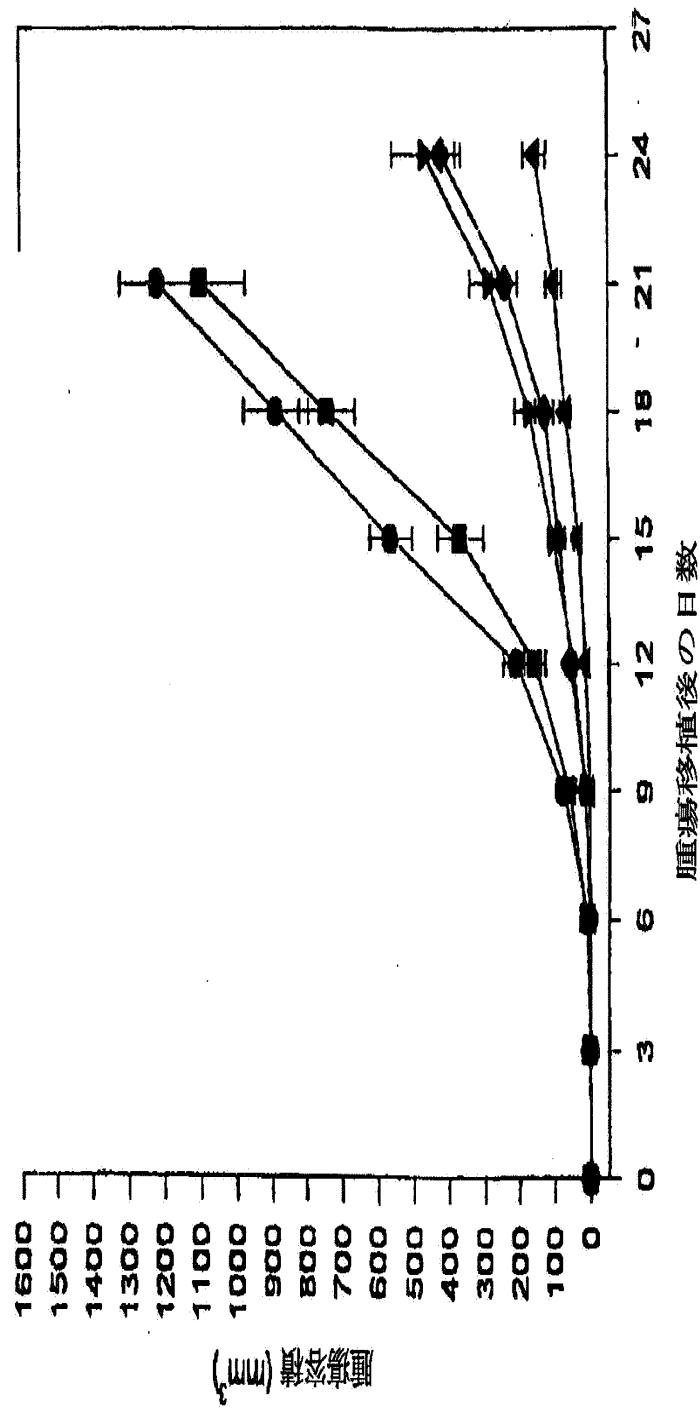


エフェクター：標的

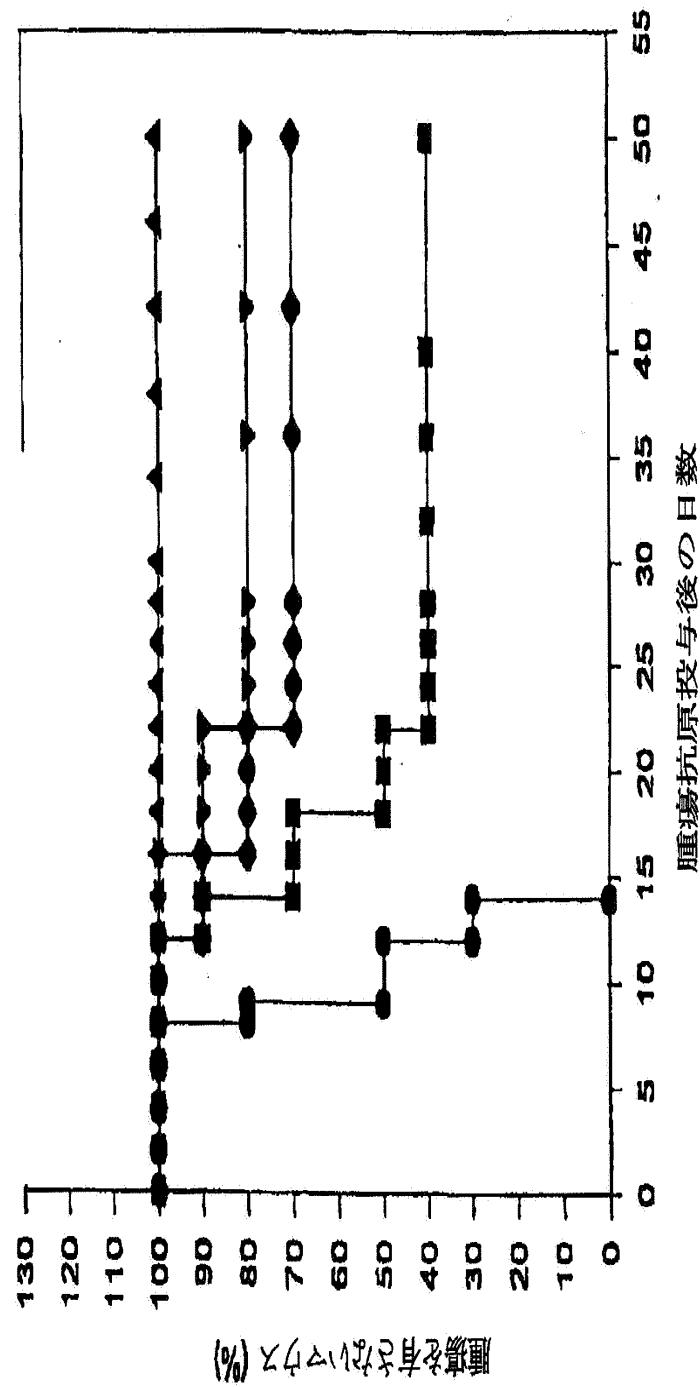
〔図 3-1〕



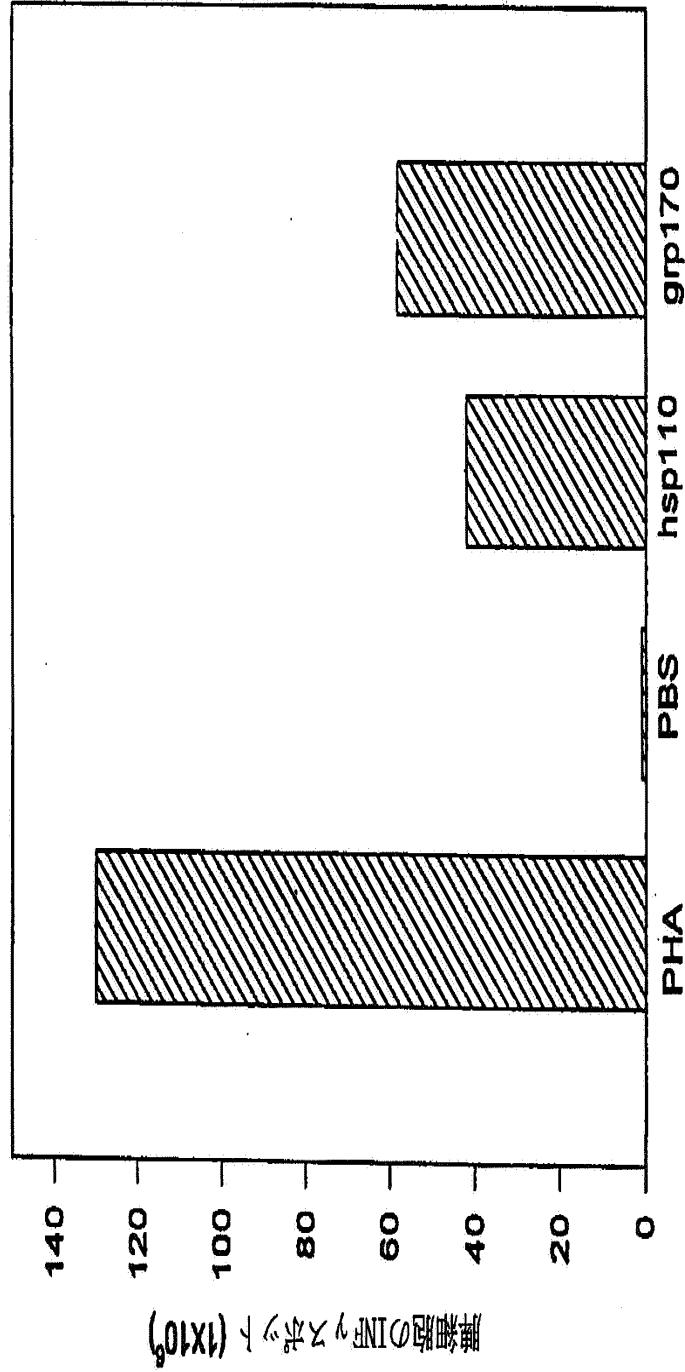
[図 3-2]



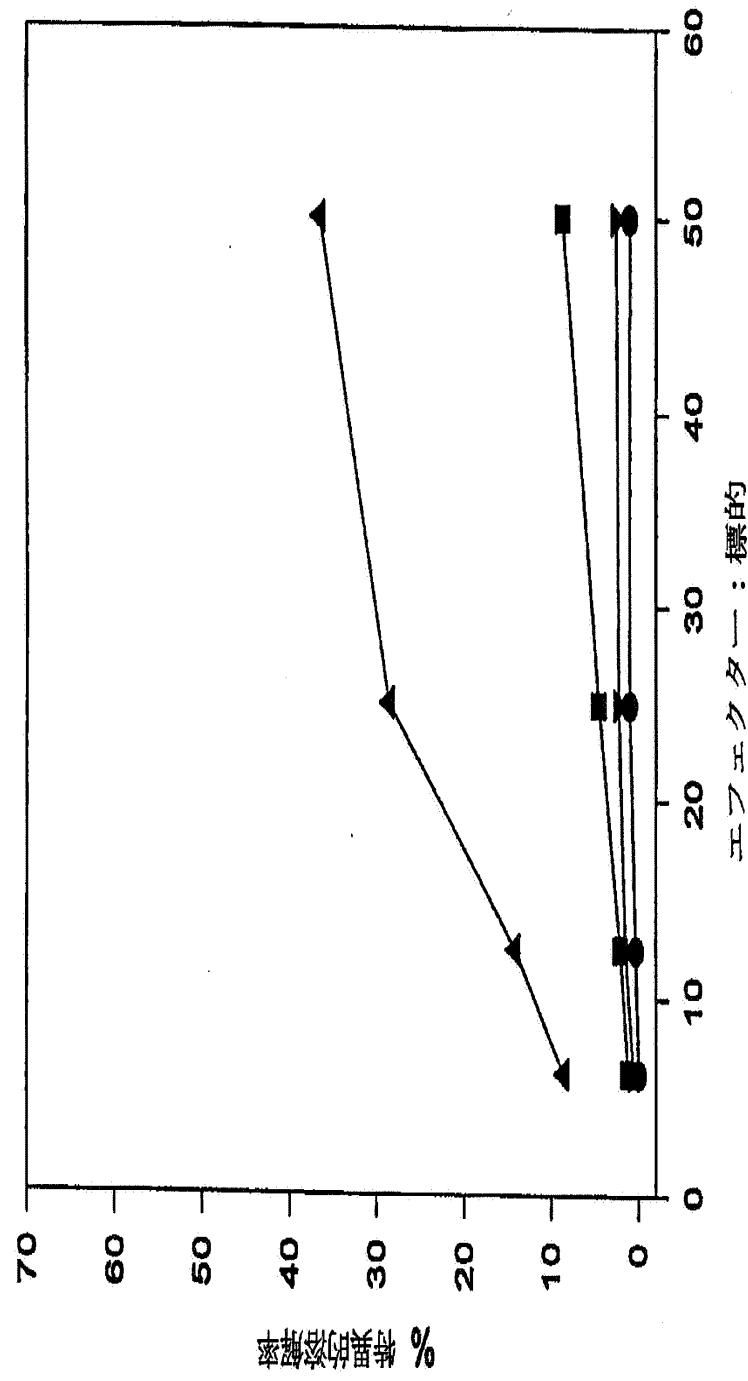
〔図 3-31〕



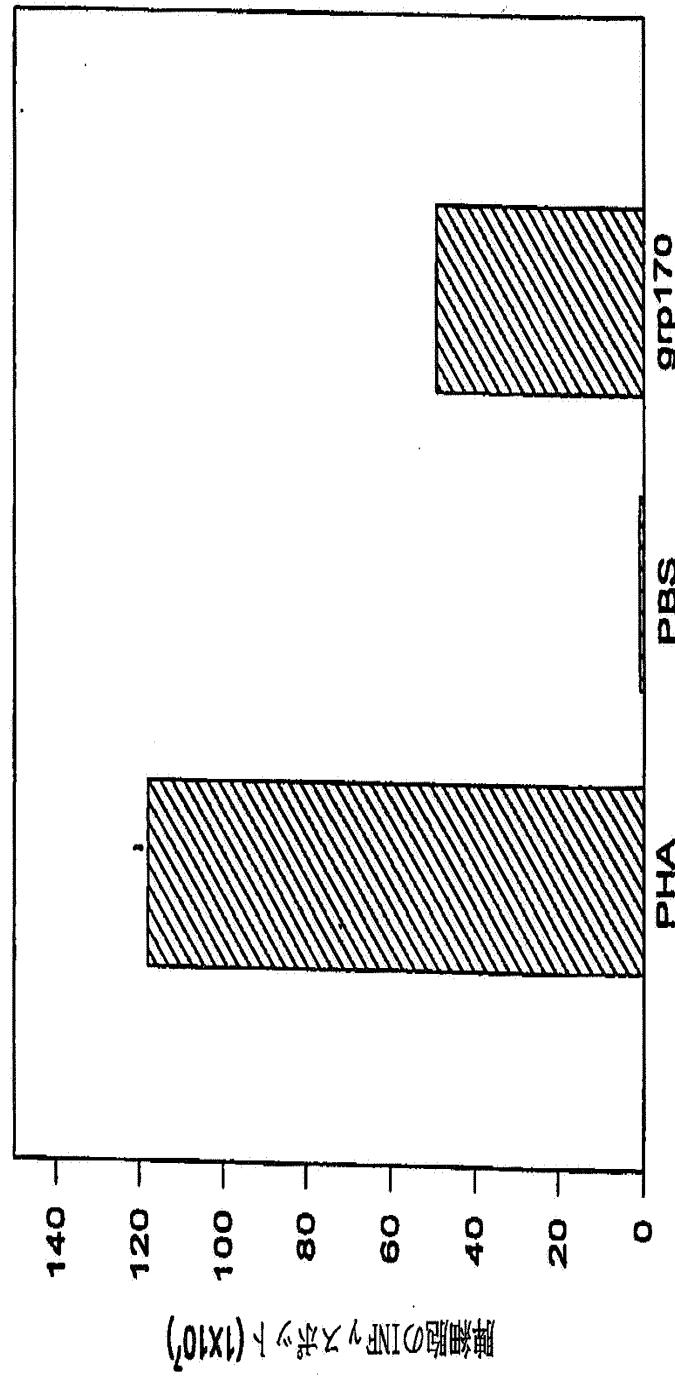
[図 3-4]



〔図 35〕



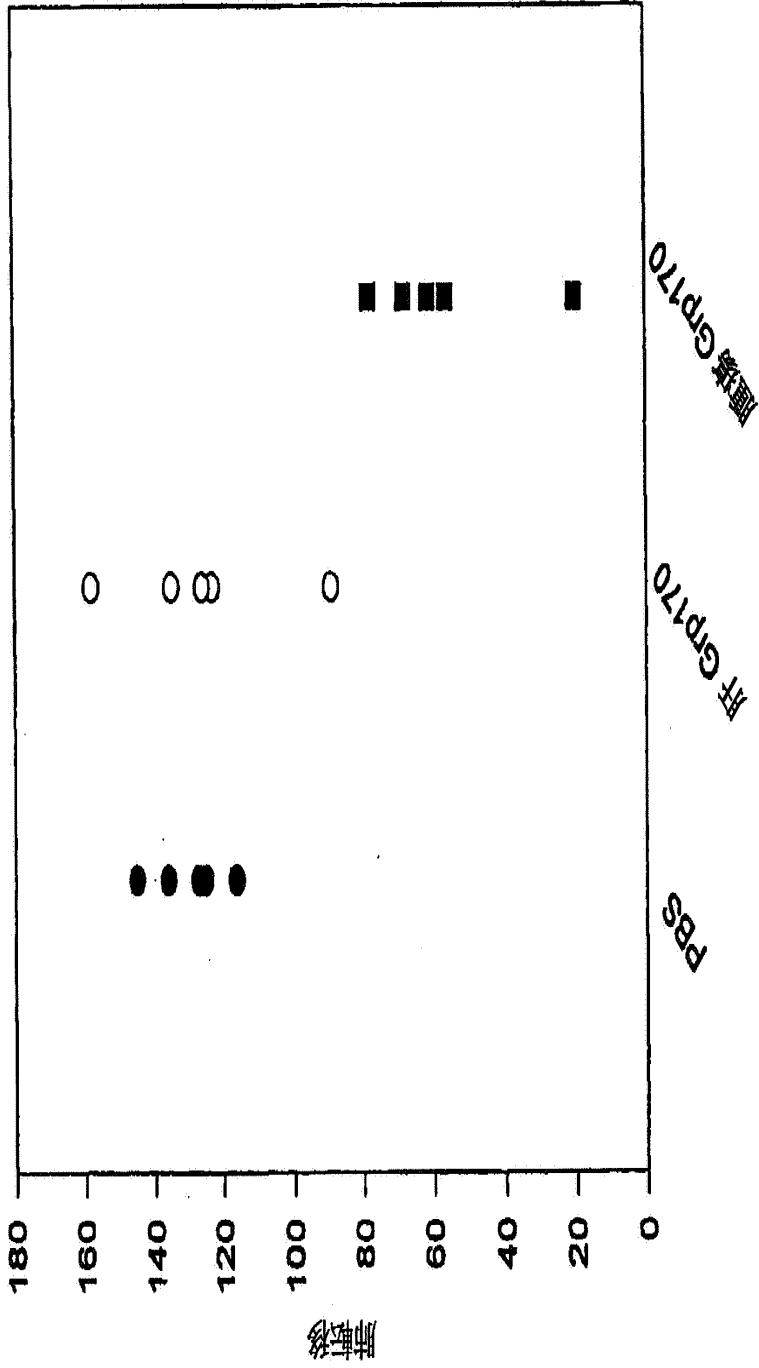
[図36]



[図37]

(120)

特表2003-510334



[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/US 00/27023
IPC 7 C07K 3/9/385 C07K 14/47 A61P 31/06 A61P 35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Elecronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 1D001 A (FORHAM UNIVERSITY) 20 March 1997 (1997-03-20) page 55, 1 line 5 -page 58, 1 line 11 claims 1-6	1-8, 16-24
X	WO 97 1D002 A (FORDHAM UNIVERSITY) 20 March 1997 (1997-03-20) page 7, 1 line 23 - 1 line 35 page 29, 1 line 29 -page 30, 1 line 18 claims 1-4	1-8, 11-14, 16-36
X	WO 96 1D411 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 11 April 1996 (1996-04-11) page 9, 1 line 17 - 1 line 26 page 15, 1 line 25 - 1 line 29 claims 1-18	1-8 16-24
X Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A document defining the general state of the art which is not earlier than the filing date of the application but which may be considered prior art under the law of the country of publication. *E document published on or after the international filing date. *L document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another document or research (as special evidence). *O other document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other manner of public availability prior to the international filing date but later than the priority date claimed. *P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed. 		
Date of the actual completion of the international search		
29 March 2001		Date of mailing of the international search report
12/04/2001		Authorized officer
		S Matou, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category		Entered, mail Application No. PCT/US 00/27023	Relevant to claim no.
X	WO 98 34641 A (FORHAM UNIVERSITY 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document	1-8, 11-24, 33-36,	
X	WO 99 07860 A (STRESSGEN BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 18 February 1999 (1999-02-18) claims 1-36	1-10, 16-19, 22-24, 34-36, 41-46,	
A	D R PALLEROS ET AL: "Hsp70-protein complexes" MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 September 1995 (1995-09-21) claims 1-36	1-8, 16-24, 33-36, 41-46	
A	D R PALLEROS ET AL: "Hsp70-protein complexes" MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 September 1995 (1995-09-21) claims 1-36	1-46	
A	DILLON D C ET AL: "Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel Nycobacterium tuberculosis mtb39 gene family" INFECTION AND IMMUNITY, US AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, WASHINGTON DC vol. 67 no. 6 June 1999 (1999-06), Pages 2941-2950, XP002143391 ISSN: 0019-9567 cited in the application abstract	1-46	
A	CHEN X ET AL: "THE 170 kDa GLUCOSE REGULATED STRESS PROTEIN IS A LARGE HSP70-HSP110-LIKE PROTEIN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM" FEBS LETTERS NL ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 380, no. 1/02 12 February 1996 (1996-02-12), Pages 68-72, XP002060249 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-46	

Form PCT/EP/200 (continuation of second sheet) (1-9-92)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patient document cited in search report		Publication date	Patient family member(s)		Int'l. Appl. No. PCT/US 00/27023
Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date	
WO 9710001 A	20-03-1997	US AU AU EP JP US US	5837251 A 703101 B 7018196 A 0859631 A 11514985 T 6139841 A 6162436 A 6143299 A		17-11-1998 18-03-1999 01-04-1997 26-08-1998 21-10-1999 31-10-2000 19-12-2000 07-11-2000 24-10-2000 07-04-1997
WO 9710002 A	20-03-1997	US AU AU EP JP US US ZA	5985270 A 728929 B 6973596 A 0857068 A 11612433 T 6156302 A 9607756 A		16-11-1999 18-01-2001 01-04-1997 12-08-1998 26-10-1999 05-12-2000 16-04-1997
WO 9610411 A	11-04-1996	US AU AU CA CN CN EP JP US	5750119 A 709643 B 2281995 A 2201498 A 1167440 A 0784477 A 10506628 T 6017544 A		12-05-1998 02-09-1999 26-04-1996 11-04-1996 10-12-1997 23-07-1997 30-06-1998 25-01-2000
WO 9834641 A	13-08-1998	US AU AU EP EP ZA	6017540 A 724772 B 6145598 A 0973548 A 9800978 A		25-01-2000 28-09-2000 26-08-1998 26-01-2000 17-08-1998
WO 9907860 A	18-02-1999	AU BR CN EP PL	6492498 A 9812272 A 1270635 T 1002110 A 338478 A		01-03-1999 18-07-2000 18-10-2000 24-05-2000 06-11-2000
WO 9524923 A	21-09-1995	US AU AU CA EP JP US	5961979 A 701732 B 2100995 A 2185651 A 0750513 A 10501520 T 6048530 A		05-10-1999 04-02-1999 03-10-1995 21-09-1995 02-01-1997 10-02-1998 11-04-2000

プロシトページの続き

	(51) Int.C1.	識別記号	F I C O 7 K 14/195	マーク (参考)
	A 6 1 P C 1 2 N	35/00 5/06 5/10	14/47 14/82	14/47 14/82
//	C O 7 K	14/195 14/47 14/82 19/00	A 6 1 K C 1 2 N	19/00 37/02 5/00
	C 1 2 N	15/09		Z N A E B A
(31)	優先権主張番号	6 0 / 2 1 5 , 4 9 7	15/00	
(32)	優先日	平成12年6月30日(2000. 6. 30)		
(33)	優先権主張国	米国 (U.S.)		
(81)	指定国	E P (A.T., B.E., C.H., C.Y., D.E., D.K., E.S., F.I., F.R., G.B., G.R., I.E., I T., L.U., M.C., N.L., P.T., S.E.), O.A.(B.F., B.J , C.F., C.G., C.I., C.M., G.A., G.N., G.W., M.L., M.R., N.E., S.N., T.D., T.G.), A.P.(G.H., G.M., K E., L.S., M.W., M.Z., S.D., S.L., S.Z., T.Z., U.G , Z.W.), E.A.(A.M., A.Z., B.Y., K.G., K.Z., M.D., R.U., T.J., T.M.), A.E., A.G., A.L., A.M., A.T., A.U., A.Z., B.A., B.B., B.G., B.R., B.Y., B.Z., C A., C.H., C.N., C.R., C.U., C.Z., D.E., D.K., D.M , D.Z., E.E., E.S., F.I., G.B., G.D., G.E., G.H., G.M., H.R., H.U., I.D., I.L., I.N., I.S., J.P., K E., K.G., K.P., K.R., K.Z., L.C., L.K., L.R., L.S , L.T., L.U., L.V., M.A., M.D., M.G., M.K., M.N., M.W., M.X., M.Z., N.O., N.Z., P.L., P.T., R.O., R U., S.D., S.E., S.G., S.I., S.K., S.L., T.J., T.M , T.R., T.T., T.Z., U.A., U.G., U.Z., V.N., Y.U., Z.A., Z.W		
(72)	発明者	サブジエック ジヨン アール. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ウィリ アムズビル フランクハウザー ロード 66		
(72)	発明者	ヘンダーソン ロバート エイ. アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ウエスト ガバメント ウェイ 3316 リバスキー エリザベス エイ. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ウィリ アムズビル フランクハウザー ロード 66		
(72)	発明者	カジム ラティフ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 アマーネ スト 41 トーンクロフト レーン		

(72) 発明者 ワン シャンシャン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 バッブ
 アロー ノース パールストリート
 150

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA36 CA01 CA07
 DA02 DA03 GA11
 4B065 AA36Y AA93Y AB01 AC14
 BA01 BA30 BD50 CA24 CA45
 4C084 AA02 AA03 AA13 BA22 BA41
 BA44 NA14 ZB261 ZB352
 4C085 BA09 BB01 CC03 EE06
 4H045 AA11 AA30 BA41 CA11 CA40
 DA86 EA22 EA31 FA72 FA74

【要約の続き】
 または腫瘍細胞を殺傷する方法において、前記のT細胞
 と腫瘍細胞を接触させることができる。